

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

RITA DE CÁSSIA MELO VILHENA DE ANDRADE FONSECA DA SILVA

SÓDIO, FRUTOSE, OU SÓDIO E FRUTOSE? EFEITOS SOBRE A PRESSÃO
ARTERIAL, DIURESE E REATIVIDADE VASCULAR EM RATOS

CURITIBA

2016

RITA DE CÁSSIA MELO VILHENA DE ANDRADE FONSECA DA SILVA

SÓDIO, FRUTOSE, OU SÓDIO E FRUTOSE? EFEITOS SOBRE A PRESSÃO
ARTERIAL, DIURESE E REATIVIDADE VASCULAR EM RATOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos.

CURITIBA

2016

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de **RITA DE CASSIA MELO VILHENA DE ANDRADE FONSECA DA SILVA**, intitulada: "**Sódio, Frutose, ou Sódio e Frutose? Efeitos Sobre a Pressão Arterial, Diurese e Reatividade Vascular em Ratos**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação.

Curitiba, 23 de Março de 2016.



Prof JOSÉ EDUARDO DA SILVA SANTOS (UFPR)
(Presidente da Banca Examinadora)



Prof ALEXANDRA ACCO (UFPR)



Prof DANIEL FERNANDES (UEPG)



Prof MICHEL FLEITH OTUKI (UFPR)




Prof REGINA DE SORDI (UEPG)


ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM FARMACOLOGIA

No dia vinte e tres de Março de dois mil e dezesseis às 13:00 horas, na sala 107, Centro Politécnico, do Setor de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS da Universidade Federal do Paraná, foram instalados os trabalhos de arguição da doutoranda **RITA DE CASSIA MELO VILHENA DE ANDRADE FONSECA DA SILVA** para a Defesa Pública de sua Tese intitulada: "**Sódio, Frutose, ou Sódio e Frutose? Efeitos Sobre a Pressão Arterial, Diurese e Reatividade Vascular em Ratos**". A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Professores Doutores: **JOSÉ EDUARDO DA SILVA SANTOS (UFPR)**, **ALEXANDRA ACCO (UFPR)**, **DANIEL FERNANDES (UEPG)**, **MICHEL FLEITH OTUKI (UFPR)**, **REGINA DE SORDI (UEPG)**. Dando início à sessão, a presidência passou a palavra a discente, para que a mesma expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. A aluna respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais e, depois, solicitou que os presentes e a doutoranda deixassem a sala. A Banca Examinadora, então, reuniu-se sigilosamente e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela **APROVAÇÃO** da aluna. A doutoranda foi convidada a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora, outorgando-lhe o Grau de **Doutor em FARMACOLOGIA**. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, **JOSÉ EDUARDO DA SILVA SANTOS**, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 23 de Março de 2016.



Prof **JOSÉ EDUARDO DA SILVA SANTOS (UFPR)**
(Presidente da Banca Examinadora)




Prof **ALEXANDRA ACCO (UFPR)**



Prof **DANIEL FERNANDES (UEPG)**



Prof **MICHEL FLEITH OTUKI (UFPR)**



Prof **REGINA DE SORDI (UEPG)**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por ter colocado em meu caminho pessoas maravilhosas como os meus pais Germano e Sueli que foram a base da minha educação e exemplo de conduta, amor e carinho em todos os momentos de minha vida.

Ao meu querido marido Ives por seu amor, incentivo e companheirismo incondicional. Obrigada pela compreensão e por estar sempre ao meu lado.

Aos meus amados filhos Lucas, André, Pedro Henrique e minha nora querida Ana Paula, pelo estímulo, paciência e por me darem coragem para continuar mesmo em momentos não tão fáceis nesta jornada.

Às minhas irmãs e cunhados Regina e Vilson, Sueli e Renato e Mônica e Marcos pelo carinho e apoio que foram fundamentais para a minha formação.

Aos meus sobrinhos e sobrinhas que sempre me incentivaram e apoiaram, meu muito obrigada.

Agradeço ao professor Dr. José Eduardo, meu orientador, pela confiança, incentivo e pelos ensinamentos científicos que tiveram início durante o mestrado.

À professora Dra. Maria Consuelo de Andrade Marques por ter despertado em mim o interesse pela Farmacologia.

À Priscila de Souza pela colaboração e auxílio nos experimentos que tornaram este trabalho possível. À Sandra Crestani e Bruna Sant’Helena pela amizade e apoio fundamentais para meu crescimento acadêmico.

À Angélica Bernardelli pelo seu carinho e companheirismo.

À Yanna Rattmann que mesmo convivendo juntas por pouco tempo no Lab 74, sempre demonstrou seu apoio e incentivo.

Aos alunos do laboratório de Florianópolis que me receberam de braços abertos, Danillo Macedo, Karla Guarido, Thiago Corrêa, Elaine Anton, Ruy Ascenso e Daiana Vogel.

Às minhas colegas e amigas de departamento, Haíssa Brito, Luisa Mota, Daniele Ferreira, obrigada pela amizade, cooperação e incentivo.

À Adriane Madeira pelo apoio, otimismo e bom humor “sempre”.

Aos professores, Dr. Daniel Fernandes, Dra. Regina de Sordi, Dra. Alexandra Acco e Dr. Michel Otuki, por comporem a banca examinadora e pelas correções e excelentes sugestões.

À professora Juliana Chichorro por sua atenção e apoio.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da UFPR, Ely de Fátima, Patrícia Nair e Sílvia por sempre me acolherem bem.

Aos funcionários do biotério pela atenção e cuidados com os animais utilizados neste trabalho.

Aos animais meu maior respeito.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro.

Enfim a todos que de alguma maneira contribuíram e fizeram parte desta equipe para que este trabalho fosse executado, meu sincero agradecimento!

Muito Obrigada!

“A ciência é muito mais que um corpo de conhecimentos. É uma maneira
de pensar”

“Nós somos, cada um de nós, um pequeno universo”

Carl Sagan

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA	12
Conceituação	12
Epidemiologia.....	12
Mecanismos envolvidos no controle da pressão arterial.....	14
Aspectos fisiológicos e estruturais dos vasos sanguíneos.....	16
Mecanismos de regulação do tônus vascular	18
Participação do endotélio na regulação do tônus vascular	21
Papel fisiológico do óxido nítrico	23
Funções fisiológicas do NO.....	26
O NO e a formação de espécies reativas de oxigênio	27
Disfunção endotelial.....	29
Efeito da dieta com sal e frutose na função cardiovascular	33
2. OBJETIVOS	38
2.1 OBJETIVO GERAL.....	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3. MATERIAL	39
3.1 ANIMAIS	39
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	39
3.3 DROGAS E SAIS.....	41
3.4 REAGENTES.....	41
3.5 ANTICORPOS	42
4. METODOLOGIAS	42
4.1 Avaliação do consumo alimentar e hídrico e do ganho ponderal.....	42
4.2 Avaliação da diurese, pH e densidade da urina.....	42
4.3 Avaliações bioquímicas e parâmetros hematológicos	43
4.4 Avaliações macroscópicas da aorta torácica, do rim e do coração dos animais	43

4.5 Medidas da pressão arterial pelo método direto em ratos anestesiados	44
Procedimento cirúrgico.....	44
Protocolo experimental.....	45
4.6 MEDIDAS DA PRESSÃO ARTERIAL VIA PLETISMOGRAFIA (<i>TAIL-CUFF</i>)	45
4.7 RIM ISOLADO	46
Procedimento cirúrgico para isolar o rim	46
Protocolo experimental.....	47
4.8 Avaliação da reatividade do leito arterial mesentérico	48
Procedimento cirúrgico.....	48
Protocolo experimental.....	48
4.9 MEDIDA DA REATIVIDADE VASCULAR DE ANÉIS DE AORTA ISOLADA DE RATO.....	49
Isolamento e montagem em banho de órgãos	49
4.10 PROTOCOLOS PARA ANÁLISE DA REATIVIDADE VASCULAR.....	50
Avaliação da reatividade vascular da aorta para fenilefrina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio	50
Efeito da adição cumulativa de vasoconstritores em anéis de aorta do grupo frutose 6% e controle	50
Determinação da participação da via NO/GCs na reatividade de anéis de aorta do grupo frutose 6%.....	51
Efeito da inibição da ciclooxygenase sobre a contração induzida pela fenilefrina	52
Estudo da participação do cálcio e da via de sensibilização ao cálcio na reatividade de anéis de aorta do grupo frutose 6%.....	52
Efeito dos bloqueadores de canais de K ⁺ na contração induzida pela fenilefrina em anéis de aorta de animais do grupo frutose 6% e controle	53
Efeito dos sequestradores de NO na reatividade em anéis de aorta do grupo frutose 6%	53
4.11 QUANTIFICAÇÃO DOS INDICADORES ENZIMÁTICOS E NÃO ENZIMÁTICOS DO ESTRESSE OXIDATIVO	54
Quantificação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).....	54
Quantificação da atividade da enzima catalase	55
Quantificação da atividade da enzima glutational peroxidase (GPx)	55
Quantificação da atividade da enzima glutational-S-transferase (GST)	56
Quantificação dos níveis da glutational reduzida (GSH).....	56
Determinação dos níveis de hidroperóxidos lipídicos	57
4.12 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DA VIA RHOA/ROCK	57

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
5. RESULTADOS	59
5.1. Efeito das dietas NaCl 4%, Frutose 6% e NaCl 4%/Frutose 6% no consumo de ração, água, ganho de peso, diurese, perfil hematológico e peso dos órgãos .	59
5.2 Alterações macroscópicas no rim de ratos NaCl 4% e NaCl 4%/Frutose 6%..	64
5.3 Efeito do consumo de ração acrescida de sódio e/ou frutose na pressão arterial média e reatividade vascular em ratos anestesiados	65
5.4 Efeito da dieta na pressão arterial sistêmica e na frequência cardíaca de ratos sem o efeito de anestésico	69
5.5 Avaliação da pressão de perfusão vascular renal (PPVR) em ratos expostos a dieta acrescida de NaCl 4%, Frutose 6% e NaCl 4 %/ Frutose 6%	70
5.6 Reatividade do leito vascular mesentérico (LVM) de ratos expostos a dieta contendo NaCl 4% e /ou frutose 6%.....	70
5.7 Estudo da reatividade vascular em preparações de aorta isolada de rato.....	73
5.7.1 Relaxamento vascular dependente de endotélio induzido pela acetilcolina e independente de endotélio induzido pelo nitroprussiato de sódio	73
5.7.2 Reatividade vascular induzida por vasoconstritores em aorta de rato com ou sem endotélio	73
5.7.3 Reatividade vascular induzida por vasoconstritores em artéria carótida com endotélio funcional.....	77
5.7.4 Participação da via NO/GCs na hiporreatividade vascular induzida pela fenilefrina em aorta de ratos do grupo controle e Frutose 6%.....	78
5.7.5 Ausência da participação de prostanóides na reatividade da aorta de rato do grupo controle e Frutose 6%	80
5.7.6 Efeito da dieta Frutose 6% na homeostasia do cálcio intracelular e extracelular e da via de sensibilização ao cálcio em aorta de rato.....	82
5.7.7 Participação de canais de potássio na perda de reatividade à fenilefrina em anéis de aorta do grupo Frutose 6%	85
5.7.8 Influência das espécies reativas de oxigênio na hiporreatividade para fenilefrina em aorta de rato do grupo Frutose 6%	87
5.8 Níveis da atividade enzimática e não enzimática das defesas antioxidantes em aorta de ratos dos grupos Controle e Frutose 6%	90
6. DISCUSSÃO	91
.....	109
7. CONCLUSÕES	110
8. REFERÊNCIAS.....	111

RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) permanece como um dos maiores riscos para morbidade e mortalidade cardiovascular e seu controle ainda é um desafio para a área da saúde. A inclusão de alimentos industrializados à dieta resultou em aumento significativo no consumo de sal e mais recentemente de açúcares, entre eles a frutose. Dada a importância da dieta na função cardiovascular, este trabalho buscou investigar a influência do acréscimo de NaCl 4%, frutose 6% e a associação de NaCl 4% com frutose 6% à dieta de ratos *Wistar*, a qual foi implementada a partir do desmame por um período de 6 semanas. Em nosso modelo experimental as diferentes dietas não modificaram parâmetros metabólicos importantes como o peso e o índice glicêmico. Mas, a pressão arterial média (PAM), mensurada em ratos anestesiados no final do tratamento foi maior em ratos expostos à dieta NaCl 4%/Frutose 6%. Além disso, a pressão arterial sistólica (PAS), avaliada semanalmente a partir da quarta semana em ratos sem o efeito de anestésicos, revelou-se elevada nos grupos tratados com NaCl 4%/Frutose 6% e Frutose 6%, assim como a frequência cardíaca. A combinação NaCl 4%/Frutose 6% também elevou a pressão de perfusão vascular renal basal, e o consumo das diferentes dietas levou a uma hiper-reatividade do leito vascular renal à fenilefrina. A pressão de perfusão do leito vascular mesentérico (LVM) ao final do tratamento manteve-se inalterada em todos os grupos. Porém o tratamento com dieta NaCl 4%/Frutose 6% e Frutose 6% tornou o leito hipo-reativo à fenilefrina. Frente a esses resultados, passamos a investigar a reatividade vascular da artéria aorta no grupo Frutose 6%. A ação vasodilatadora da acetilcolina foi menos potente no grupo tratado com Frutose 6%, enquanto o efeito vasodilatador do nitroprusiato de sódio mostrou-se aumentado, o que foi evitado com a remoção do endotélio vascular. Em aortas de ratos expostos à dieta Frutose 6% observamos hipo-reatividade aos efeitos constritores induzidos pela adição da fenilefrina, angiotensina I e angiotensina II, efeito este que foi revertido pela remoção do endotélio vascular, bem como pela presença do inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase o L-NAME e do inibidor da guanilato ciclase solúvel (ODQ), assim como pelo sequestrador de óxido nítrico o carboxi-PTIO. A hipo-reatividade à fenilefrina também ocorreu em anéis de aorta (com endotélio funcional) do grupo Frutose 6% mantidos em meio livre de cálcio. Por sua vez, o inibidor da Rho-kinase Y-27632 reduziu a contração máxima induzida pela fenilefrina em anéis de aorta de ratos expostos à dieta padrão, mas não modificou a hipo-reatividade em artéria aorta de ratos tratados com Frutose 6%, e teve sua curva de relaxamento deslocada para a esquerda em anéis de aorta desse mesmo grupo. A expressão ou atividade da SERCA2 ou da RhoA não foi diferente entre os grupos controle e Frutose 6%. Por outro lado a dieta Frutose 6% reduziu a expressão da ROCK I. A utilização do inibidor não seletivo de canais de potássio (TEA) e do inibidor de canais de potássio ativados por voltagem (4-AP) restaurou a

contração induzida pela fenilefrina no grupo exposto à Frutose 6%. A hiporeatividade dependente de endotélio à fenilefrina foi restaurada na presença do tempol sequestrador de ânion superóxido e da apocinina inibidor da atividade da NADPH oxidase. A dieta Frutose 6% também comprometeu a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e da glutatona (GSH), e elevou os níveis da hidroperoxidação lipídica. Nossos resultados mostraram que a associação de quantidades moderadas de Frutose 6% e a associação de NaCl 4%/Frutose 6% à dieta foram capazes de elevar a pressão arterial de ratos. Além disso, a dieta Frutose 6% comprometeu a biologia vascular que parece ser em decorrência de maior produção de NO pelo endotélio vascular resultando em produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs).

Palavras-chave: Hipertensão arterial, Disfunção vascular, Óxido nítrico, Hiporeatividade, Espécies reativas de nitrogênio.

ABSTRACT

Hypertension remains one of the biggest risk factors for cardiovascular morbidity and mortality and its control remains a challenge for the health control. Consumption of processed food resulted in a significant increase in the consumption of salt and more recently increased consumption of sugars, including fructose. Given the importance of diet in cardiovascular function this study investigated the influence of the addition of moderate amounts of sodium and fructose. For this, Wistar male rats (21 days old) received chow containing NaCl 4%, Fructose 6% and the association of NaCl 4%/Fructose 6% and standard chow for 6 weeks. In our experimental model the different diets did not alter important metabolic parameters such as the weight gain and glycemic index. But, mean arterial pressure (MAP) measured in anesthetized rats, at the end of treatment was greater in rats exposed to diet containing NaCl 4%/Fructose 6% and systolic blood pressure (SBP) assessed weekly from the fourth week in rats without the influence of anesthetics, was elevated in both, rats exposed to NaCl 4%/Fructose 6% and Fructose 6% diet, as well as heart rate. The association of NaCl 4% and Fructose 6% in diet also increases the baseline of vascular renal perfusion pressure, and the consumption of the different diets lead to hyperactivity of vascular renal to phenylephrine. The perfusion pressure in the mesenteric vascular bed (MVB) remained unchanged in all groups at the end of treatment. However, when the MVB was exposed to phenylephrine in increasing concentration we noted that consumption of NaCl 4%/Fructose 6% and Fructose 6% diets induced hypo-contraction of mesenteric vascular bed. When considering these results we now investigated the vascular reactivity in aorta from Fructose 6% diet group. The relaxation induced by acetylcholine was less potent in the group treated with Fructose 6%, the opposite was observed with the addition of sodium nitroprusside, where the vasorelaxant response was more potent in the Fructose 6% feed rats. Interestingly when vascular endothelium was gently removed the vasorelaxant response was similar in both groups. In aortic rings obtained from rats exposed to Fructose 6% diet, we observed hypo-reactivity for cumulative addition of phenylephrine, angiotensin I and angiotensin II, in aortic rings with functional vascular endothelium and this was reversed by removing the vascular endothelium as well as by the inhibitor of nitric oxide synthase (L-NAME), soluble guanylate cyclase inhibitor (ODQ) and nitric oxide scavenger (carboxi-PTIO). We also noticed that the hypo contraction to phenylephrine remained even in free calcium preparations, but still remained dependent on the presence of functional endothelium. Preincubation of Y-27632 reduced the maximal contraction elicited by phenylephrine in control rings, but did not change the hypo-reactivity in aorta of rats treated with Fructose 6%. The relaxation induced by Y-27632 was more potent in aorta obtained from Fructose 6% diet group. The expression of SERCA2 and RhoA were similar in both groups. Moreover, Fructose 6% diet reduced the expression of ROCK I. The hypo-responsiveness to phenylephrine was restored in the presence of

a nonspecific inhibitor of potassium channel (TEA) and the selective voltage dependent potassium channel blocker (4-AP). The hypo-responsiveness endothelium dependent was reversed by tempol (superoxide scavenger) and apocynin (NADPH oxidase inhibitor). The fructose diet also compromises the activity of antioxidant enzymes, like superoxide dismutase (SOD), and glutathione (GSH) and raises the levels of lipid hydroperoxidation in aorta from Fructose 6% diet group. Our results indicated that the amount of dietary fructose necessary to raise blood pressure in normotensive and healthy rats is substantially below the commonly used 60% fructose adopted in previous studies. Furthermore, Fructose 6% diet compromised vascular biology which seems to be due to higher production of nitric oxide and increased production of reactive nitrogen species.

Key-words: High blood pressure, Vascular dysfunction, Nitric oxide, Hypo-reactivity, Reactive nitrogen species.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Corte transversal da parede do vaso.....	17
Figura 2- Substâncias vasorelaxantes produzidas e liberadas pelo endotélio vascular.....	22
Figura 3- Formação do óxido nítrico.....	25
Figura 4- Mecanismo pelo qual a angiotensina II, através da ativação de receptor AT ₁ modula a disfunção endotelial.....	31
Figura 5- Esquema resumido do metabolismo hepático da frutose.....	35
Figura 6- Representação esquemática do desenho experimental.....	40
Figura 7- Consumo de ração, água, diurese e ganho de peso.....	60
Figura 8- Registro fotográfico dos rins direito e esquerdo obtidos de ratos expostos a dieta modificada contendo NaCl 4%, Frutose 6% e NaCl 4%/Frutose 6%, na sexta semana de tratamento.....	64
Figura 9- Efeito do consumo por seis semanas da dieta modificada com NaCl 4% e Frutose 6% no peso seco e úmido do rim.....	65
Figura 10- Aumento na pressão arterial média basal de ratos expostos à dieta acrescida de NaCl 4%/Frutose 6%.....	66
Figura 11- Influência da dieta sobre o efeito hipertensivo da fenilefrina, vasopressina, angiotensina I e angiotensina II.....	67
Figura 12- Influência da dieta sobre o efeito hipotensor da acetilcolina e bradicinina em ratos anestesiados.....	68
Figura 13- Pressão arterial sistólica de ratos acordados na quarta e na sexta semana de tratamento.....	69
Figura 14- Alterações na reatividade vascular renal em resposta à fenilefrina e a vasopressina em preparações renais obtidas de animais dos grupos NaCl 4%, Frutose 66% NaCl 4%/Frutose 6% e seus controles.....	71

Figura 15- Redução na reatividade do leito vascular mesentérico dos grupos Frutose 6% e NaCl 4%/Frutose 6% para fenilefrina e vasopressina.....	72
Figura 16- Relaxamento induzido pela administração cumulativa de acetilcolina ou nitroprussiato de sódio em anéis de aorta.....	74
Figura 17- Redução da reatividade vascular à fenilefrina em anéis de aorta obtidos de animais expostos a dieta contendo frutose 6%.....	75
Figura 18- Hipo-reatividade vascular dos anéis de aorta com endotélio funcional para angiotensina I ou angiotensina II grupo Frutose6%.....	76
Figura 19- Hipo-reatividade vascular em artéria carótida para adição cumulativa de fenilefrina ou angiotensina II.....	77
Figura 20- Aumento da reatividade vascular induzida pela fenilefrina em anéis de aorta na presença do L-NAME ou do ODC.....	79
Figura 21- Resposta contrátil induzida pela fenilefrina em aorta na presença do carboxi-PTIO ou do 1400W.....	80
Figura 22- Contração induzida pela fenilefrina na presença de inibidores da produção de prostanóides.....	81
Figura 23- Participação do endotélio na reatividade da aorta em meio livre de cálcio.....	83
Figura 24- Efeito do composto Y-27632 sobre a reatividade de anéis de aorta.....	84
Figura 25- Redução na expressão da ROCK I em aorta de ratos expostos à dieta com Frutose 6%.....	85
Figura 26- Efeito dos bloqueadores de canais de potássio TEA e 4 A-P na reatividade da aorta para fenilefrina em aorta de rato exposto a dieta com Frutose 6%.....	86
Figura 27- Efeito dos bloqueadores de canais de potássio glibenclamida e iberiotoxina na reatividade da aorta de rato com dieta Frutose 6% para fenilefrina.....	87

Figura 28- Efeito da inibição da produção de ânion superóxido na reatividade vascular para fenilefrina em aorta de ratos do grupo controle e Frutose 6%.....	88
Figura 29- Efeito da apocinina e da Peg-catalase na contração induzida pela fenilefrina em aorta de ratos do grupo controle e Frutose 6%.....	89
Figura 30- Esquema proposto para as principais contribuições do ONNO ⁻ possivelmente envolvidas na hipo-reatividade à fenilefrina em aortas de ratos tratados com dieta Frutose 6%.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Efeito da dieta acrescida de NaCl 4%, Frutose 6% e NaCl 4%/Frutose 6% nos parâmetros plasmáticos.....	61
Tabela 2- Efeito da ração contendo quantidades aumentadas de NaCl 4%, Frutose 6% e NaCl 4%/Frutose 6% nos níveis plasmáticos de ácido úrico, creatinina e glicose.....	62
Tabela 3- Efeito do consumo de ração acrescida de NaCl 4%, Frutose 6% e NaCl 4%/Frutose 6% no peso relativo da aorta, rim e coração.....	63
Tabela 4- Nível da atividade enzimática e não enzimática das defesas antioxidantes em aorta de rato dos grupos controle e Frutose 6%.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	- Acetilcolina
Ang II	- Angiotensina II
ACTH	- Hormônio corticotrófico
ADH	- Hormônio Antidiurético
AMPc	- Monofosfato cíclico de Adenosina 3', 5'
ANOVA	- Análise de variância
ATP	- Trifosfato de adenosina
AT ₁ R	- Receptor para angiotensina II subtipo AT1
AT ₂ R	- Receptor para angiotensina II subtipo AT2
AVP	- Vasopressina
Ca ²⁺	- Cálcio
CAT	- Catalase
Cl ⁻	- Cloreto
CT	- Controle
DMSO	- Dimetilsulfóxido
ECA	- Enzima conversora de angiotensina
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	- Espécies reativas de oxigênio
ERNs	- Espécies reativas de nitrogênio
GCs	- Guanilato Ciclase Solúvel
GLUT	- Transportador de glicose (<i>Glucose transporter</i>)
GMPc	- Monofosfato cíclico de guanosina 3', 5'
GPx	- Glutathione peroxidase
GST	- Glutathione-S-transferase
GTP	- Trifosfato de Guanosina
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
HAS	- Hipertensão Arterial sistêmica
ACE	- Inibidor da enzima conversora de angiotensina

IP ₃	- Trifosfato de Inositol
K ⁺	- Íon potássio
L-NAME	- N ^ω -nitro-L-arginina Metil éster
MLCK	- Cinase da cadeia leve da miosina
MLC	- Cadeia leve da miosina
Na ⁺	- Íon sódio
NPS	- Nitroprussiato de sódio
NO	- Óxido nítrico
NOS	- Óxido nítrico sintase
NOS-III	- Óxido nítrico sintase endotelial
NOS-II	- Óxido nítrico sintase induzida
NOS-I	- Óxido nítrico sintase neuronal
O ₂ ⁻	- Ânion superóxido
OH ⁻	- Radical hidroxila
ONOO ⁻	- Peroxinitrito
PA	- Pressão arterial
PAT-1	- Transportador de ânion
PAS	- Pressão arterial sistêmica
PBS	- Salina tamponada com fosfato
PSS	- Solução salina fisiológica
PNA	- Peptídeo natriurético atrial
PAM	- Pressão arterial média
PGs	- Prostaglandinas
PGE ₂	- Prostaglandina E ₂
PGI ₂	- Prostaciclina
PE	- Fenilefrina
PKA	- Proteína cinase dependente de AMPc
PKC	- Proteína cinase C
PKG	- Proteína cinase dependente de GMPc

PLC	- Fosfolipase C
PNA	- Peptídeo natriurético atrial
PPVR	- Pressão de perfusão vascular renal
ROCK	- Rho cinase
SBH	- Sociedade Brasileira de Hipertensão
SOD	- Superóxido dismutase
SRAA	- Sistema renina angiotensina aldosterona
SERCA2	- Ca^{2+} ATPase tipo 2 no retículo sarcoplasmático
TG	- Triglicerídeos
TXA ₂	- Tromboxano A2
VLDL	- Lipoproteína de densidade muito baixa

1. INTRODUÇÃO

1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

Conceituação

A pressão arterial (PA) é definida como força/unidade de área. Portanto, a PA depende de fatores físicos como volume sanguíneo e a capacidade da circulação, sendo resultante da combinação instantânea entre o volume minuto cardíaco (ou débito cardíaco, que é igual a frequência cardíaca x volume sistólico), e da resistência periférica (SBC/SBH, 2006). Em outras palavras, a PA corresponde à força que o sangue bombeado pelo coração gera contra a parede distensível dos vasos, sendo determinada pelo volume de sangue que sai do coração (débito cardíaco), e a resistência que ele encontra para circular na periferia (resistência vascular periférica).

A hipertensão arterial primária, essencial ou idiopática, é a forma mais comum de hipertensão, correspondendo a 90-95% de todos os casos da doença (CARRETERO; OPARIL, 2000). A hipertensão arterial secundária possui prevalência de 3-10% e suas causas são identificáveis, sendo que doenças renais são a causa mais frequente (LAWLOR; SMITH, 2005). Níveis elevados de glicocorticoides, especialmente cortisol (síndrome de Cushing), ou por administração de esteroides (GSCHWANDTNER *et al.*, 1997), também podem elevar a pressão arterial. Outros transtornos, como o hipertireoidismo, o hiperaldosteronismo primário ou secundário e tumores como os feocromocitomas, assim como o uso crônico de alguns medicamentos também podem levar ao desenvolvimento da hipertensão secundária (GROSSMAN *et al.*, 2015; THOMAS, R. M. *et al.*, 2015).

Epidemiologia

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada quando a pressão arterial sistólica está igual ou acima de 140 mm Hg, e a pressão arterial diastólica está igual ou acima de 90 mm Hg (Revista Brasileira de Hipertensão, 2010). A prevalência global da HAS é de 20% na população adulta. O

número estimado de indivíduos hipertensos em 2000 foi de aproximadamente 972 milhões e a projeção para 2025 é que teremos 1,56 bilhão de hipertensos no mundo, o que representará cerca de 30% da população mundial. Esse crescimento será maior em países economicamente desenvolvidos, sendo que cerca de 75% da população hipertensa residirá em países desenvolvidos (WILLIAMS, 2009).

A HAS permanece como um dos maiores riscos para morbidade e mortalidade cardiovascular no mundo e no Brasil, e seu controle ainda é um desafio para a área da saúde (CHOBANIAN *et al.*, 2003). Em pesquisa recente feita pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014), 21,4% dos pesquisados admitiram diagnóstico de hipertensão arterial, o que corresponderia a 31,3 milhões de pessoas no Brasil. A mesma pesquisa também aponta que mais de 6 milhões de brasileiros acima de 18 anos possuem algum tipo de doença cardíaca.

A prevalência da HAS é de 60% em indivíduos na faixa etária acima de 65 anos (SBC/SBH, 2006). O excesso de peso é um fator que eleva a pressão arterial desde a idade jovem, assim como o tabagismo e o consumo excessivo de álcool (NOLA *et al.*, 2010; SLADE; KIM, 2014). Esses dados mostram que a elevação da pressão arterial deverá manter-se como uma das mais importantes e evitáveis causas de morte prematura em todo o mundo, pelo menos nas próximas 2 décadas. Além do aumento alarmante na prevalência da hipertensão na população adulta, a hipertensão essencial (assintomática em 90-95% dos casos) está se tornando comum entre os jovens e adolescentes (FIELDS *et al.*, 2004).

Fatores genéticos associados a fatores do meio ambiente estão associados durante a elevação da pressão arterial. Dentre os fatores do meio ambiente a dieta vem se destacando como um fator independente de elevação da pressão arterial. O estilo de vida em países desenvolvidos inclui cada vez mais o consumo de alimentos processados ricos em sal e açúcares (VASDEV *et al.*, 2007a). O consumo excessivo de sal e açúcar será abordado em tópico mais adiante.

O tratamento da hipertensão arterial inclui medidas farmacológicas associadas a medidas não farmacológicas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHITWORTH; CHALMERS, 2004), o tratamento não medicamentoso consiste em mudanças no estilo de vida que objetivam a redução da pressão arterial, tais como a prática de exercícios físicos, redução de peso e alimentação sem excessos de sal, açúcar ou gordura. Quando

o tratamento não farmacológico não promove redução satisfatória dos níveis pressóricos, deve ser instituído o tratamento farmacológico (SBC/SBH, 2006) (HACKAM *et al.*, 2010).

O tratamento com fármacos anti-hipertensivos visa manter a perfusão tecidual adequada pela manutenção da circulação, reduzindo a morbidade e mortalidade cardiovascular. Neste estudo não abordaremos os mecanismos de ação de fármacos anti-hipertensivos, os quais foram revisados em detalhes em diversas publicações recentes (HACKAM *et al.*, 2010; OPARIL; SCHMIEDER, 2015).

A permanência da pressão arterial em níveis elevados causa alterações funcionais e estruturais em órgãos-alvo como vasos sanguíneos, coração, rins e cérebro (WILLIAMS *et al.*, 2004). A incidência da hipertensão pode levar à demência e até mesmo deficiência cognitiva e acidente vascular cerebral (KOHLENER *et al.*, 2014). No coração ocorrem modificações estruturais do miocárdio (hipertrofia ventricular esquerda) que resultam em insuficiência cardíaca, e manifestações de isquemia em decorrência de doença arterial coronariana obstrutiva aterosclerótica (DELLSPERGER; MARCUS, 1990; POLESE *et al.*, 1991). A lesão vascular decorre da pressão que ocorre pelo estresse mecânico sobre a parede do vaso, a qual inicialmente atinge a microcirculação, e mais tardiamente os grandes vasos, causando danos ao endotélio vascular (BLANKENHORN; KRAMSCH, 1989). A manutenção prolongada de quadros hipertensivos tem efeito também sobre os rins, sendo um importante fator para o desenvolvimento da insuficiência renal crônica (HARLOS; HEIDLAND, 1994).

Mecanismos envolvidos no controle da pressão arterial

Nos humanos a PA pode variar a todo instante para manter o organismo em equilíbrio. No entanto, raramente a PA desvia-se mais do que 10 a 15% dos valores de referência. A manutenção bem como a variação da PA momento a momento depende de mecanismos complexos que determinam ajustes apropriados da frequência e contratilidade cardíaca, do estado contrátil dos vasos de resistência e de capacitância, e da distribuição de fluidos dentro e fora dos vasos (SBH, 2005).

Esses mecanismos são agrupados de acordo com o tempo necessário à reação para produzir uma resposta (GUYTON, 1991). Vale ressaltar que os mecanismos são

geridos pelo organismo em tempo real, atuando de maneira contínua e em conjunto enquanto dormimos, trabalhamos, comemos etc.

A primeira linha de defesa contra as manifestações agudas de hipertensão ou hipotensão são os barorreceptores, quimiorreceptores e o sistema nervoso central (SNC). A resistência vascular e o débito cardíaco são duas variáveis que são reguladas pelo sistema nervoso autônomo. O tônus venoso é regulado pelo sistema nervoso simpático, enquanto a frequência cardíaca e a contração do miocárdio são reguladas pelas duas divisões do sistema nervoso autônomo, o simpático e parassimpático (SAPER, 2002). Os barorreceptores são mecanorreceptores sensíveis à distensão que pode ocorrer nas paredes dos vasos de acordo com a variação da pressão intravascular. Essa capacidade de perceber variações na PA faz dos barorreceptores estruturas importantes para o controle simpático e parassimpático das funções do coração e vasos (SOUZA NETO *et al.*, 2003). Além da resposta neural rápida, o SNC também controla a liberação de hormônios. Durante queda sustentada da pressão arterial, por exemplo, os barorreceptores percebem a queda da pressão nos vasos e levam esta informação para o sistema nervoso simpático que libera noradrenalina, que por sua vez estimula a liberação de adrenalina pela medula adrenal e liberação de vasopressina pela neuro-hipófise, além disso, ocorre aumento nos níveis plasmáticos de renina por ativação dos receptores β_1 -adrenérgicos no rim. O cérebro também contribui para a regulação da PA a longo prazo, uma vez que a denervação renal, ou lesões no cérebro, podem atenuar ou atrasar o desenvolvimento da hipertensão (DIBONA; KOPP, 1997; JACOB *et al.*, 2005).

Em algumas formas de hipertensão ocorre aumento na atividade simpática (SCHLAICH *et al.*, 2004), sendo esta relação entre atividade do SNC e desenvolvimento de HAS, reforçada pela eficácia de alguns fármacos anti-hipertensivos, que estimulam receptor α_2 -adrenérgico pré-sináptico no SNC, reduzindo o tônus simpático, como fazem a metildopa e a clonidina.

O controle a longo prazo da pressão arterial é regulado principalmente pelos rins. Alterações nas concentrações de sódio e no volume extracelular são percebidas pelos rins, o aumento de pressão nos capilares promove um aumento na eliminação de água e sais, sendo que o oposto também ocorre. Ou seja, durante a queda da pressão arterial, há ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) que estimula a

reabsorção de sódio e água pelos rins, elevando o volume de líquido extracelular e consequentemente elevando a PA.

O SRAA pode ser definido como uma cascata hormonal que envolve peptídeos, enzimas e receptores específicos, cuja ação clássica refere-se à regulação de funções cardiovasculares, renais e adrenais, mantendo o balanço de fluidos e eletrólitos do organismo, bem como o controle da pressão arterial. (FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008). A angiotensina II (AII), um dos produtos principais dentro do SRAA, possui efeito vasoconstritor, aumentando a resistência periférica. Na glândula suprarrenal a AII estimula a zona glomerulosa do córtex, aumentando a síntese e a secreção de aldosterona, que por sua vez atua sobre o rim para aumentar a expressão de canais epiteliais de sódio, o que leva a retenção de sódio e água, aumentando assim o volume sanguíneo (ALLEN *et al.*, 2000; HOLLENBERG, 2004). A secreção de renina, a ativação simpática, a hipovolemia e a hipotensão também estimulam a secreção de vasopressina da glândula pituitária posterior, a qual além de ser um potente vasoconstritor aumenta a expressão de aquaporinas no ducto coletor renal, aumentando a reabsorção de água (BANKIR, 2001). Dessa maneira ocorre aumento do volume plasmático e consequentemente aumento da pressão arterial. Apesar de existirem vários mecanismos de regulação da pressão arterial os vasos sanguíneos têm papel de destaque no controle da pressão arterial.

Aspectos fisiológicos e estruturais dos vasos sanguíneos

Os vasos são classificados de acordo com sua função ou distribuição, podendo ser de condutância ou de resistência. Os vasos de condutância como, por exemplo, a artéria aorta, a artéria renal, a artéria carótida e a artéria mesentérica, possuem como função principal o papel de conduzir e distribuir o débito cardíaco para os tecidos. Esses vasos possuem grande quantidade de material elástico, e, por consequência, resultando num sistema de baixa resistência (FOLKOW *et al.*, 1973; O'ROURKE, 1990). Por sua vez, artérias de calibres menores têm como principal componente da túnica média o tecido muscular liso, e possuem importância central no controle local do fluxo e na determinação da resistência regional, bem como na resistência periférica total. Os vasos de menor calibre possuem uma camada muscular espessa apresentando grandes alterações no

diâmetro do vaso frente a estímulos hemodinâmicos e neuro-humorais o que permite aos vasos participarem da regulação da pressão arterial (MULVANY; AALKJAER, 1990).

A Figura 1 ilustra a constituição da parede dos vasos sanguíneos, que é formada de três camadas distintas, a adventícia, que é a mais externa, a camada média que é a intermediária, e a íntima que é a mais interna. Embora essas camadas estejam bem representadas nos vasos de maior calibre, em artérias menores podem possuir variações importantes em espessura e composição, ou até mesmo podem estar ausentes. A única camada que está presente em todos os vasos é a camada íntima.

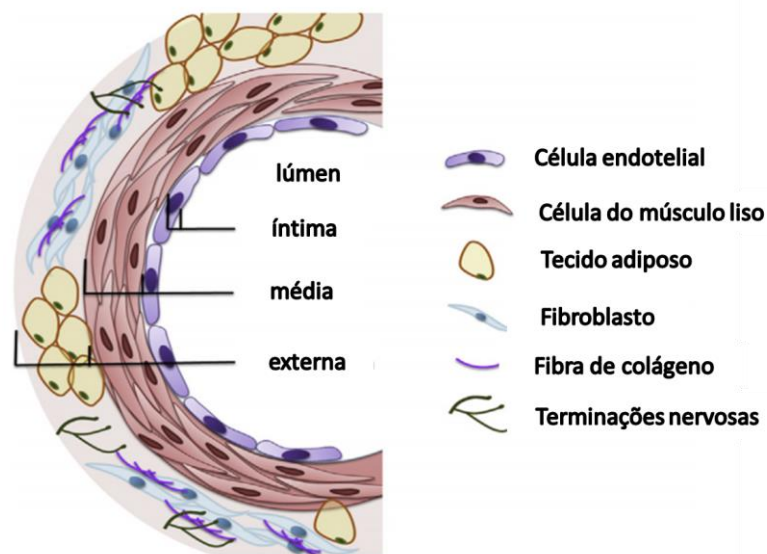


Figura 1: Corte transversal da parede do vaso. A parede do vaso é constituída por três camadas: camada íntima (formada pelas células endoteliais), camada média (constituída por células do músculo liso vascular), e camada externa (contem tecido adiposo, fibroblastos, colágeno e terminações nervosas) (adaptado de: Yingzi Zhao, 2015).

A camada adventícia contém quantidades variáveis de fibras de colágeno e, em alguns casos, contêm fibras elásticas. Possui também vasos sanguíneos destinados à nutrição do vaso e terminações nervosas (HAURANI; PAGANO, 2007). Na sua parte mais externa a camada adventícia possui tecido adiposo perivascular, que secretam adipocinas que podem contribuir para a regulação do tônus vascular (KLESCHYOV *et al.*, 2000; SOLTIS; CASSIS, 1991).

A camada média, que é a mais espessa, é constituída por células do músculo liso vascular e elastina em quantidades que variam de acordo com o tipo de vaso (artéria ou

veia) responsável por controlar a diâmetro do vaso, por vasoconstrição ou vasodilatação. O músculo liso vascular é que medeia a contração e a dilatação dos vasos sanguíneos (MICHEL, 1998). Os eventos celulares envolvidos na regulação da contratilidade vascular são discutidos a seguir.

Mecanismos de regulação do tônus vascular

A contração das células do músculo liso vascular pode ter início mecanicamente ou por ativação farmacológica, por exemplo, a partir da ação de ligantes em receptores presentes na superfície das membranas celulares, o que através da ativação das vias de transdução intracelular¹ leva ao aumento na concentração de cálcio livre no meio intracelular, oriundo dos estoques intracelulares ou do influxo após abertura de canais de cálcio localizados na membrana celular (CRIBBS, 2001; JI *et al.*, 2002). O Ca^{2+} livre no meio intracelular se liga à calmodulina, formando o complexo Ca^{2+} /calmodulina, o qual, ativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), que fosforila a cadeia leve da miosina (MLC). A fosforilação da MLC permite a interação da miosina com a actina promovendo a contração (KARAKI *et al.*, 1997; WEBB, 2003).

O mecanismo de contração do músculo liso vascular, além de ser dependente da concentração de cálcio, depende também do estado de fosforilação da MLC, que é regulado pela ação da fosfatase da MLC (MLCP). A MLCP desfosforila a MLC, inibindo a contração. A atividade da fosfatase da miosina é regulada pela ativação da proteína G pequena RhoA, que tem como alvo a Rho cinase (ROCK), que após ser ativada fosforila e inibe a fosfatase da miosina (SOMLYO; SOMLYO, 2000; UEHATA *et al.*, 1997). O aumento na expressão ou na atividade das enzimas que participam da contração do músculo liso vascular pode contribuir para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como, por exemplo, a hipertensão (CHITALEY *et al.*, 2001)

O relaxamento do músculo liso vascular geralmente ocorre pela diminuição da concentração de cálcio intracelular, o que reduz a fosforilação da cadeia leve da miosina.

¹ A ligação de um hormônio ou um neurotransmissor ao receptor acoplado à proteína G, estimula a atividade da fosfolipase C (PLC), esta enzima é específica para a formação de segundos mensageiros como o IP_3 e o diacilglicerol (DAG) a partir do fosfolípido de membrana fosfatidilinositol 4,5- bifosfato. O IP_3 se liga a receptores específicos no retículo sarcoplasmático e promove a liberação de cálcio dos estoques intracelulares para o citosol. O DAG juntamente com o cálcio ativa a proteína cinase C (PKC) que fosforila proteínas alvo específicas, como por exemplo, canais de Ca^{2+} tipo-L.

Agentes vasodilatadores frequentemente agem sobre os níveis de adenosina 3', 5' – monofosfato cíclico (AMPC) e de guanosina 3', 5' – monofosfato cíclico (GMPc), os quais ativam, respectivamente, a proteína cinase A (PKA) e a proteína cinase G (PKG). A PKA e a PKG fosforilam e inativam a MLCK, promovendo o relaxamento das células musculares lisas, favorecendo a perda do tônus muscular (FORSTERMANN *et al.*, 1986; IGNARRO *et al.*, 1986; RAPOPORT; MURAD, 1983).

O relaxamento do músculo liso vascular em resposta a um estímulo envolvendo o endotélio é conhecido como relaxamento dependente de endotélio, e envolve a liberação de pelo menos um fator relaxante derivado do endotélio (EDRF). Os dois EDRFs mais conhecidos são o óxido nítrico (NO) e a prostaciclina (PGI_2). Está bem demonstrado que o relaxamento vascular dependente de endotélio é sempre acompanhado de hiperpolarização mediada por ativação dos canais de potássio (K^+). O NO e a prostaciclina são conhecidos por promover relaxamento vascular, pelo menos em parte, por meio da ativação de canais de potássio (FARACI; HEISTAD, 1998; NELSON; QUAYLE, 1995). A hiperpolarização dependente de endotélio reflete parte do mecanismo de relaxamento promovido pelo NO e/ou prostaciclina (COHEN; VANHOUTTE, 1995).

Canais de K^+ têm um papel importante na regulação do potencial de repouso da membrana das células musculares vasculares e no tônus vascular (FARACI; HEISTAD, 1998).

A abertura de um canal de potássio presente na membrana das células do músculo liso vascular aumenta o efluxo de K^+ para o meio extracelular, reduzindo a carga positiva no lado interno da célula, o que gera um potencial negativo através da membrana, que é a hiperpolarização (SOBEY, 2001). A hiperpolarização leva ao fechamento de canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca^{2+}), reduzindo a entrada de Ca^{2+} e consequentemente inibindo a contração. O oposto, o fechamento do canal de K^+ , contribui para a despolarização, para a abertura do canal de cálcio dependente de voltagem, aumento na concentração de cálcio intracelular e consequente vasoconstrição. Como o principal regulador do potencial de ação de membrana do músculo liso vascular, a atividade dos canais de K^+ é um importante determinante do tônus e do diâmetro dos vasos, participando do mecanismo de vasodilatação (NELSON; QUAYLE, 1995).

Nas células endoteliais e no músculo liso arterial já foram identificados pelo menos 4 tipos principais de canais de K^+ . Canais de potássio sensíveis à voltagem K_v (GUTMAN *et*

al., 2003), canais de potássio ativados por cálcio K_{Ca} , incluindo os de baixa (SK_{Ca} ou K_{Ca2}), intermediária (IK_{Ca} ou K_{Ca3}), de alta condutância (BK_{Ca} , ou K_{Ca1}) (WEI *et al.*, 2005), canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP} ou $K_{ir1.x}$, $K_{ir4.x}$, $K_{ir5.x}$ e $K_{ir7.x}$), e; canais de potássio de influxo retificante ($K_{ir2.x}$ e $K_{ir3.x}$) (KUBO *et al.*, 2005). A nomenclatura descrita acima foi determinada por pesquisadores em Comitês Internacionais realizados pela IUPHAR (*International Union of Pharmacology*). Porém para fins didáticos os canais de potássio serão descritos, neste trabalho, de acordo com a classificação anterior que o associa com o mecanismo que regula o canal.

Os K_v são ativados pela despolarização da membrana e acabam por limitar a despolarização, reduzindo a vasoconstrição e assim mantendo o tônus vascular de repouso (NELSON; QUAYLE, 1995). Mediadores como o AMPc, o NO, e o GMPc, dentre outros, podem ativar os K_v em alguns vasos sanguíneos. O inibidor mais seletivo de canais K_v no músculo liso vascular é a 4-aminopiridina (4-AP) (JACKSON, 2000; NELSON; QUAYLE, 1995; SOBEY, 2001).

Os canais de potássio do tipo K_{Ca} estão presentes em grande número nas células do músculo liso vascular, sendo ativados quando ocorre elevação dos níveis intracelulares de cálcio e pela despolarização da membrana (JACKSON, 2000; MICHELAKIS *et al.*, 1997; NELSON; QUAYLE, 1995; SOBEY, 2001). O NO e o GMPc, por exemplo, podem ativar diretamente esses canais (BOLOTINA *et al.*, 1994; JACKSON, 2000; NELSON; BRAYDEN, 1993). Os agentes farmacológicos mais conhecidos que bloqueiam este canal são o tetraetilamônio (TEA) (LANGTON *et al.*, 1991), a iberiotoxina (IbTx) e a caribdotoxina (MILLER, C. *et al.*, 1985).

Os K_{ATP} são inibidos quando os níveis intracelulares de ATP estão elevados sendo a razão ATP/ADP no meio intracelular um dos fatores que regulam a sua abertura. A atividade destes canais está diretamente associada com a atividade metabólica da célula (FARACI; HEISTAD, 1998; SOBEY, 2001). Vasodilatadores endógenos que aumentam os níveis de AMPc, como a adenosina (MERKEL *et al.*, 1992), e a prostaciclina (JACKSON *et al.*, 1993), que ativam esses canais, o que contribui para os efeitos vasodilatadores e hipotensores dos mesmos. Vasoconstritores como angiotensina II, vasopressina, noradrenalina e endotelina inibem o canal K_{ATP} via ativação da PKC e aumento da síntese de ATP (QUAYLE *et al.*, 1997; RODRIGO; STANDEN, 2005). A glibenclamida é o bloqueador mais comumente utilizado para estudos que envolvem o

K_{ATP} (SOBEY, 2001), os quais são descritos como relativamente sensíveis ao TEA (NELSON *et al.*, 1990).

Participação do endotélio na regulação do tônus vascular

A porção mais interna dos vasos é constituída de uma única camada de células, que constituem o endotélio vascular, o qual se encontra em contato direto com o fluxo sanguíneo. O endotélio vascular reveste todos os vasos sanguíneos (BAUER; SOTNIKOVA, 2010; FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Por muitos anos o endotélio vascular foi considerado somente como uma barreira celular, porém em 1980 Furchgott e Zawadzki relataram que o endotélio vascular liberava um fator capaz de relaxar a musculatura lisa (chamado inicialmente como fator relaxante derivado do endotélio, EDRF, do Inglês *endothelium-derived relaxing factor*), o qual mais tarde foi identificado como sendo o NO (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

Desta forma, o endotélio participa da regulação do tônus vascular através de uma interação complexa entre as paredes e o lúmen dos vasos (FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989). A localização do endotélio entre o sangue circulante e o músculo liso vascular lhe confere um papel importante na manutenção da homeostasia, por controlar o equilíbrio entre vasodilatação e vasoconstrição (KASPRZAK *et al.*, 2006).

O endotélio é considerado um órgão parácrino, endócrino e autócrino ativo, pois sintetiza e libera substâncias vasoativas que atuam diretamente no músculo liso vascular, promovendo contração ou relaxamento. Dentre os vasoconstritores liberados pelo endotélio vascular vale destacar alguns derivados do ácido araquidônico (MILLER, V. M.; VANHOUTTE, 1985), a endotelina (YANAGISAWA *et al.*, 2008) e a angiotensina II (VELTMAR *et al.*, 1991).

Três mediadores endoteliais são os principais envolvidos no relaxamento vascular. O NO (FURCHGOTT, 1993; HUTCHINSON *et al.*, 1987; IGNARRO *et al.*, 1987; PALMER *et al.*, 1987), a prostaciclina (PGI₂) (MONCADA *et al.*, 1977), e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF, do Inglês *Endothelium-derived hyperpolarizing factor*) (FELETOU; VANHOUTTE, 1988).

Na Figura 2, temos uma representação do mecanismo de relaxamento vascular dependente de endotélio. Agonistas como a acetilcolina ou bradicinina liga-se a um

receptor específico localizado na membrana celular. Ativam segundos mensageiros que promovem o aumento de cálcio intracelular. O cálcio se liga à calmodulina que por sua vez ativa a óxido nítrico endotelial e converte L-arginina em NO. O NO, no músculo liso vascular, ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs) promovendo aumento nas concentrações do GMPc e levando ao relaxamento.

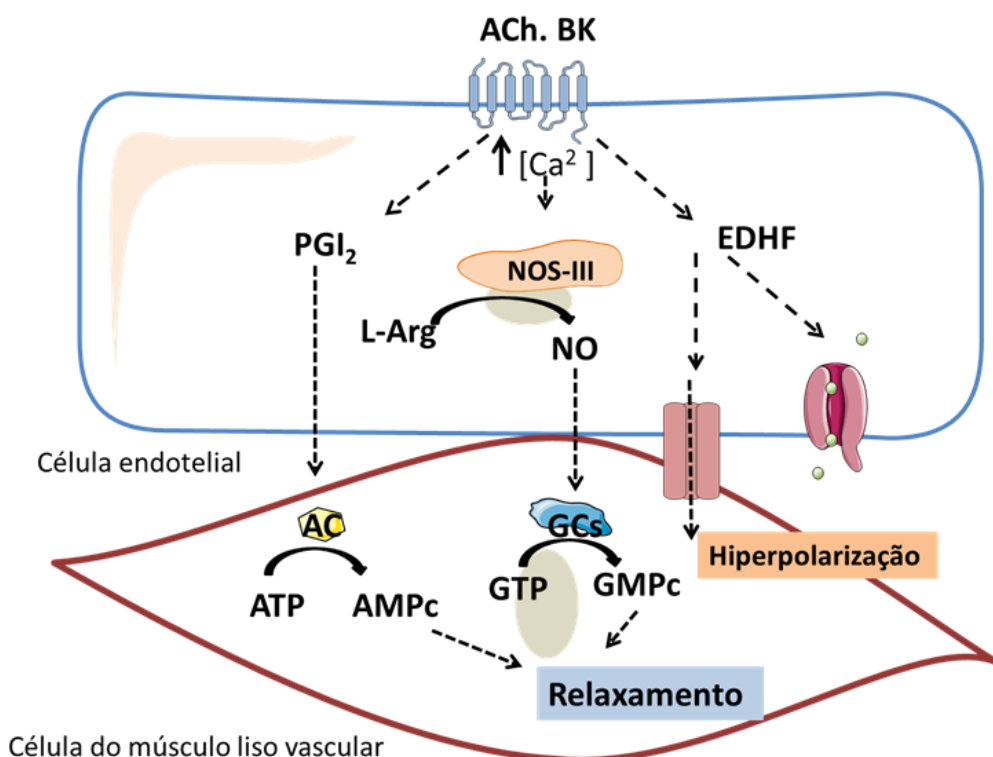


Figura 2. Substâncias vasorelaxantes produzidas e liberadas pelo endotélio vascular. As células endoteliais, após estímulo de ligantes com a acetilcolina (ACh), bradicinina (BK), ou após o estresse de cisalhamento, aumentam os níveis de cálcio livre no meio intracelular. O aumento do cálcio promove a ativação da óxido nítrico sintase endotelial e a formação do óxido nítrico (NO). Este se difunde para o músculo liso vascular e ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs) e aumento nos níveis de GMPc. O aumento de cálcio na célula endotelial também ativa a via da formação da prostaciclina (PGI_2), que promove aumento nas concentrações de AMPc, bem como a via do EDHF, que promove hiperpolarização. Como consequência ocorre o relaxamento muscular. (Adaptado de Servier Medical Art PowerPoint Image Bank, de Mombouli e Vanhoutte, 1997).

A prostaciclina (PGI_2) é sintetizada pela ação da enzima fosfolipase A_2 sobre fosfolípidios de membrana promovendo a liberação do ácido araquidônico, que é oxidado

pela enzima ciclooxygenase dando origem à prostaglandina G_2 (PGG_2), a qual é reduzida a prostaglandina H_2 (PGH_2), ainda pela ciclooxygenase. A enzima prostaciclina sintase converte a PGH_2 a prostaglandina I_2 (PGI_2 ou prostaciclina) (MONCADA *et al.*, 1976; SMITH *et al.*, 1996; VANE *et al.*, 1998). A PGI_2 produzida atua em receptores acoplados à proteína G_{as} na membrana das células do músculo liso vascular, o que leva ao aumento do AMPc, segundo mensageiro que ativa a proteína cinase A, sendo que a ativação desta cinase impede a interação da actina-miosina, ocasionando relaxamento do músculo liso vascular (HOPKINS; GORMAN, 1981).

A identidade química do EDHF ainda é desconhecida. A vasodilatação induzida por este composto parece ser mediada por uma hiperpolarização celular sem elevação nos níveis intracelulares de GMPc ou AMPc, sendo resistente aos inibidores da ciclooxygenase ou aos bloqueadores das enzimas óxido nítrico sintases (NOS) (GARLAND; MCPHERSON, 1992; MOMBOULI; VANHOUTTE, 1997; NAGAO; VANHOUTTE, 1992). O efeito vasodilatador induzido pelo EDHF é mediado pela ativação de canais de K^+ localizados na membrana das células do músculo liso vascular. Como mencionado anteriormente, a hiperpolarização impede a ativação de canais de cálcio dependentes de voltagem, diminuindo as concentrações de cálcio livre no meio intracelular e gerando relaxamento. Os principais canais de potássio envolvidos na hiperpolarização induzida pelo EDHF parecem ser os canais de potássio dependentes de cálcio de baixa e intermediária condutância. Nos vasos onde é produzido, o EDHF é secretado após a ativação de receptores por ligantes como acetilcolina, bradicinina, substância P, bem como pelo estresse de cisalhamento (BUSSE *et al.*, 2002; CHEN, G.; SUZUKI, 1989; FELETOU, 2009; URAKAMI-HARASAWA *et al.*, 1997).

Papel fisiológico do óxido nítrico

O NO é formado após ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). São conhecidas três isoformas da NOS. A isoforma I, ou neuronal (NOS-I), está presente nas células neuronais do cérebro, onde o NO regula a liberação de neurotransmissores como acetilcolina, histamina e serotonina (PRAST; PHILIPPU, 2001; STRAUB *et al.*, 2007). A NOS-I também é expressa em miócito cardíaco e esquelético (KOBZIK *et al.*, 1994; XU *et al.*, 1999), músculo liso vascular, células endoteliais (BACHETTI *et al.*, 2004;

BOULANGER *et al.*, 1998), na camada adventícia das artérias penianas (BURNETT *et al.*, 1992), e células da mácula densa nos rins (BACHMANN *et al.*, 1995).

A isoforma II, ou induzida (NOS-II), pode ser expressa em vários tipos de células em resposta a citocinas, lipopolissacarídeos, tumores, ou outros agentes infecciosos. Na maioria dos tipos celulares, e em especial nos vasos, a presença da NOS-II é mínima em condições fisiológicas. Entretanto, uma vez expressa esta isoforma produz NO continuamente, de forma independente de variações na concentração de cálcio livre no meio intracelular (GROSS *et al.*, 1991). Em casos de inflamação a expressão da NOS-II é induzida no músculo liso vascular, gerando grandes quantidades de NO. Além disso, tem sido demonstrado que a atividade em larga escala das NOS-II pode resultar em disfunção vascular pela limitação da disponibilidade do cofator tetrahydrobiopterina (BH₄) para a NOS endotelial (GUNNETT *et al.*, 2005). A NOS-II gera grandes quantidades de NO e seu principal alvo são os parasitas presentes no citosol das células, participando da fisiologia dos processos inflamatórios e do choque séptico, sendo a maior causa da hipotensão, cardiodepressão e hiporreatividade vascular observada no choque séptico (SCHINI *et al.*, 1991; SPINK *et al.*, 1995).

Em condições fisiológicas a NOS endotelial (NOS-III) é responsável pela produção da maioria do NO derivado do endotélio. Por esta razão tem papel crucial na homeostasia cardiovascular (FISH; MARSDEN, 2006). Apesar da NOS-III ser expressa constitutivamente a produção de NO pode ser ativada/iniciada por vários estímulos incluindo o estresse de cisalhamento (BOO *et al.*, 2002; DIMMELER *et al.*, 1999; RUBANYI *et al.*, 1986), acetilcolina (CHEN HI *et al.*, 1996; KELLOGG *et al.*, 2005), bradicinina (DANSER *et al.*, 1998; DAVISSON *et al.*, 1996), histamina (LANTOINE *et al.*, 1998) e o 17 β -estradiol (CAULIN-GLASER *et al.*, 1997; CHEN, Z. *et al.*, 1999).

Para a síntese do NO todas as isoformas de NOS utilizam o aminoácido L-arginina como substrato e o oxigênio molecular, formando citrulina e o NO. O fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida reduzida (NADPH) atua como doador de elétrons, que são transmitidos via dinucleotídeo flavina-adenina (FAD) e mononucleotídeo de flavina (FMN) ao ferro (complexado a uma molécula de heme) em presença do BH₄. Todas as isoformas de NOS são homodímeros. Na NOS funcional o domínio C-terminal redutase de um monômero, que possui sítios de ligação para a NADPH, FMN e FAD, está acoplado ao domínio N-terminal oxigenase do monômero oposto, que contém sítios de

ligação do heme, do BH_4 e da L-arginina (ALDERTON *et al.*, 2001; CRANE *et al.*, 1998) (Figura 3).

A NOS-III também pode ser ativada por estímulos que não promovem a elevação sustentada de cálcio intracelular, como por exemplo, o estresse de cisalhamento, que ocorre com o aumento do fluxo sanguíneo nos vasos (FLEMING; BUSSE, 2003). O estresse de cisalhamento induz aumento de Ca^{++} no meio intracelular e aumento do BH_4 , um cofator essencial para a ativação da NOS-III (ANDO; YAMAMOTO, 2011; CORSON *et al.*, 1996; DIMMELER *et al.*, 1999; WIDDER *et al.*, 2007), esta ativação é mediada pela fosforilação da enzima que pode ocorrer em vários resíduos como, de serina (Ser), treonina (Thr) e tirosina (Tyr) (FLEMING; BUSSE, 2003; FULTON *et al.*, 1999).

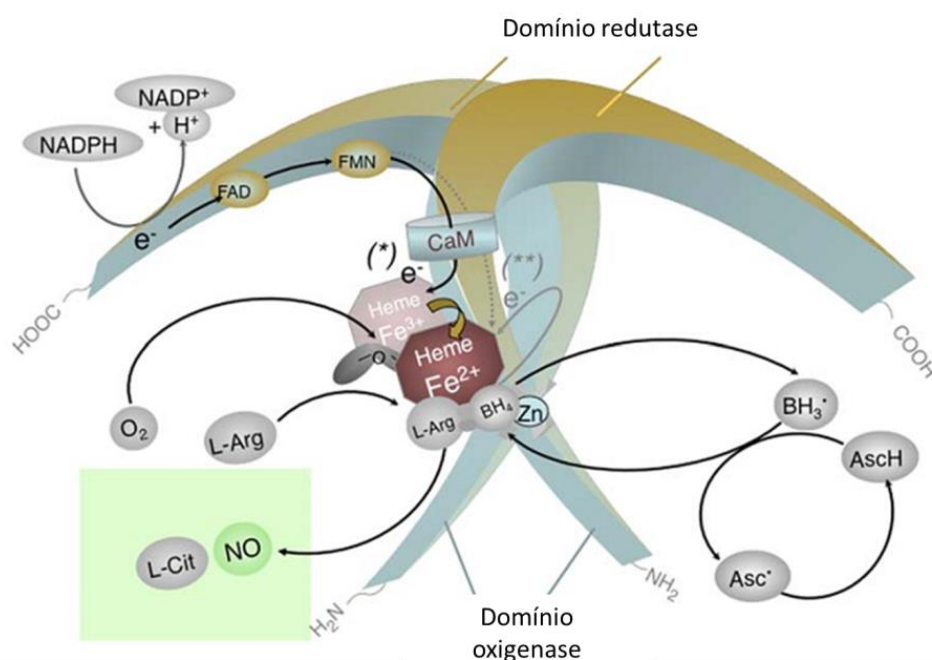


Figura 3 Representação da formação do óxido nítrico pela óxido nítrico sintase endotelial (NOS-III). A NOS-III é um homodímero que possui duas subunidades, uma com domínio redutase e outra com domínio oxigenase. Na interface do dímero a enzima contém um *cluster* de zinco (Zn), é o local onde o cofator BH_4 e o substrato L-arginina estão ligados. O elétron transferido do domínio redutase, doado pela NADPH, permite que o Fe^{3+} se ligue ao oxigênio molecular e forme o Fe^{2+} (dióxido-ferroso), que pode receber um segundo elétron, preferencialmente do BH_4 ou do domínio redutase. Esta redução ativa o oxigênio e permite a hidroxilação da L-arginina ocorrendo a formação do NO e da L-citrulina. A oxidação do BH_4 forma o radical BH_3^{\cdot} , que pode ser reciclado pela própria NOS-III (usando um elétron da flavina), ou pelo ácido ascórbico. (Adaptado de: Ulrich Förstermann, 2010).

Funções fisiológicas do NO

O NO possui várias funções biológicas e seu papel na homeostasia vascular está bem estabelecido (FORSTERMANN; MUNZEL, 2006). Dentre outros efeitos, o NO influencia o tônus vascular (IGNARRO *et al.*, 1987; IMIG; ROMAN, 1992; LOPEZ-JARAMILLO *et al.*, 1990; VALLANCE *et al.*, 1989), a proliferação de células musculares lisas (ALBINA *et al.*, 1991; YANG, Q. *et al.*, 1994), a adesão de leucócitos (KUBES *et al.*, 1993; KUBES *et al.*, 1991), e previne agregação e adesão plaquetária (BENJAMIN *et al.*, 1991; RADOMSKI *et al.*, 1987). O NO produzido pelas células endoteliais difunde-se através da membrana das células musculares lisas e se liga à guanilato ciclase solúvel (GCs), que por sua vez catalisa a conversão da guanosina trifosfato (GTP) em GMPc (CRAVEN; DERUBERTIS, 1978; DENNINGER; MARLETTA, 1999; MURAD *et al.*, 1978). O aumento nas concentrações de GMPc ativa a proteína cinase G-1 (PKG-1), levando à fosforilação de várias proteínas celulares, e reduz a concentração intracelular de cálcio livre, promovendo relaxamento vascular (SURKS *et al.*, 1999). Além disso, a PKG-1 ativada fosforila o canal de potássio ativado por cálcio de alta condutância, resultando em abertura deste canal, o que permite a saída de potássio do meio intracelular, hiperpolarização da membrana plasmática, e redução no influxo de cálcio via canal de cálcio tipo-L (ALIOUA *et al.*, 1998; FRANCIS *et al.*, 2010; WHITE *et al.*, 1993). Além disso, a PKG-1 pode fosforilar diretamente o canal de cálcio tipo – L, resultando em inibição do canal (YANG, L. *et al.*, 2007). A PKG-1 também fosforila o receptor para o IP₃ (IP₃R) suprimindo a liberação de cálcio para o meio intracelular, e a fosfolambam no retículo sarcoplasmático (SCHLOSSMANN *et al.*, 2000; WALFORD; LOSCALZO, 2003).

Esse conjunto de efeitos resulta na inibição da atividade do IP₃R, suprimindo a liberação de cálcio dos estoques intracelulares, sendo que quando a fosfolambam é fosforilada ela perde sua capacidade de inibir a Ca²⁺/ATPase (SERCA), que tem como função o sequestro de cálcio do meio intracelular para o retículo sarcoplasmático (FRANCIS *et al.*, 2010; SCHLOSSMANN *et al.*, 2000). Esta múltipla fosforilação resulta em redução no fluxo de cálcio, favorecendo o relaxamento vascular (HOROWITZ *et al.*, 1996) e vasodilatação. Adicionalmente a PKG-1 pode ativar a fosfatase da cadeia leve da miosina, reduzindo os níveis de fosforilação da MLC, desta maneira contribuindo mais uma vez com a vasodilatação (SURKS *et al.*, 1999).

O NO e a formação de espécies reativas de oxigênio

O NO também afeta indiretamente o tônus vascular regulando o ambiente redox das células vasculares (WALFORD; LOSCALZO, 2003). O NO exerce efeito antioxidante nas células vasculares reagindo com o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (WALFORD; LOSCALZO, 2003), assim como por aumentar a expressão da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FUKAI *et al.*, 2000). O H_2O_2 , por sua vez, pode ativar a NOS-III via oxidação de proteínas cinase que fosforilam a NOS-III, mecanismo que acaba por atenuar o estresse oxidativo nas células vasculares (THOMAS, S. R. *et al.*, 2002).

A quantidade de NO biodisponível livre nas células endoteliais é determinada pela atividade da NOS-III e pelo sequestro do NO, como o que ocorre através da reação com o ânion superóxido. O aumento na produção e/ou inativação inadequada do $O_2^{\cdot-}$ leva à redução na biodisponibilidade de NO. Em condições fisiológicas, as defesas antioxidantes endógenas minimizam esta interação e mantêm o balanço entre o NO e o $O_2^{\cdot-}$. Entretanto, quando o sistema oxidativo sobrecarrega o sistema antioxidante endógeno, ocorrem processos comumente denominados como estresse oxidativo (SCHAFFER; BUETTNER, 2001).

Estresse oxidativo é uma expressão usada para descrever vários processos deletérios que resultam do desequilíbrio entre a formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), e/ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs), e as defesas antioxidantes do organismo (BECKMAN; KOPPENOL, 1996; RADI *et al.*, 2002). O $O_2^{\cdot-}$, precursor da maioria das EROs, é um mediador na reação da cadeia oxidativa. A produção de $O_2^{\cdot-}$ é feita por várias enzimas, como a NADPH oxidase, a xantina oxidase (XO), a lipooxygenase, a NOS-III desacoplada e algumas enzimas do citocromo P450 (MUELLER *et al.*, 2005).

Para combater o dano oxidativo, as células possuem defesas antioxidantes enzimáticas, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), (CNUBBEN *et al.*, 2001), e defesas não enzimáticas como a glutathione peroxidase (GPx) o ácido ascórbico e os tocoferóis (LENNON *et al.*, 1991).

Fisiologicamente o ânion superóxido é um produto do metabolismo celular, em reações que ocorrem no interior das mitocôndrias, ou pode ser produzido por células

fagocitárias como função de defesa do organismo (DROGE, 2002; FINKEL, 2003). A dismutação do $O_2^{\cdot -}$ ocorre espontaneamente ou por uma reação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), o que produz o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma das EROs mais estáveis, que por sua vez pode ser convertido enzimaticamente em água pela catalase (CAT), ou pela glutatona peroxidase (GPx).

Quando formado o H_2O_2 pode atravessar as membranas celulares e formar moléculas pró-aterogênicas como o radical hidroxila (FUKAI; USHIO-FUKAI, 2011; JUNG *et al.*, 2007). Praticamente todos os tipos de células vasculares produzem $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 (GRIENDLING *et al.*, 2000). O H_2O_2 também pode reagir com metais reduzidos para ser convertido a radical hidroxila (OH^{\cdot}), que é um dos mais potentes oxidantes, ou pode ser metabolizado pela mieloperoxidase (MPO) para formar o ácido hipocloroso (HOCl) (LIOCHEV; FRIDOVICH, 1999).

Como antecipado o $O_2^{\cdot -}$ pode reagir, por exemplo, com NO^{\cdot} . Essa reação é controlada pela taxa de difusão de ambos os radicais, e o produto desta reação é o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), que é um poderoso oxidante. A interação entre o NO^{\cdot} e $O_2^{\cdot -}$ ocorre de maneira extremamente rápida, sendo três vezes mais rápida que a interação da SOD com o $O_2^{\cdot -}$, logo, em decorrência da rapidez na interação sempre há NO reagindo com $O_2^{\cdot -}$ tanto dentro das células como no espaço extracelular, o que em condições fisiológicas ocorre de forma controlada e não gera danos às células (THOMSON *et al.*, 1995).

Além da enzima SOD, para combater o estresse oxidativo nas células a enzima CAT catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio, prevenindo desta maneira a formação do radical hidroxila pela reação de Fenton (ZHANG, Y. *et al.*, 2005). A GPx é um antioxidante não enzimático, cuja função bioquímica é reduzir a hidroperoxidação lipídica a seus álcoois correspondentes e reduzir o peróxido de hidrogênio livre a água (YOSHIDA *et al.*, 1997). Apesar de existirem as defesas antioxidantes endógenas que possuem efeito positivo no combate ao estresse oxidativo, muitas vezes em condições fisiológicas não estáveis, o equilíbrio entre a produção de NO e $O_2^{\cdot -}$ é modificado, ocorrendo a formação excessiva de EROs nas células.

Disfunção endotelial

Diversas doenças cardiovasculares têm sido descritas como consequência da disfunção endotelial. A integridade funcional do endotélio é fundamental para sua atividade fisiológica. Tendo em vista os diversos efeitos mediados por substâncias produzidas pelo endotélio vascular na regulação do tônus dos vasos, é de se esperar que qualquer mínima alteração nos mesmos tenha efeitos deletérios sobre a biologia vascular. À medida que a função endotelial se deteriora a homeostasia vascular torna-se prejudicada, e entre os vários mecanismos, o estresse oxidativo parece ser o mais comum no desenvolvimento da disfunção endotelial (FORSTERMANN; MUNZEL, 2006).

A “disfunção endotelial” caracteriza-se pela redução do vasorrelaxamento dependente de endotélio, geralmente atribuída à perda da bioatividade do NO nas paredes dos vasos. A redução na biodisponibilidade do NO nos vasos pode ser causada por diminuição da expressão da NOS-III nas células endoteliais (WILCOX *et al.*, 1997), falta de substrato ou cofator para a NOS-III (MANGGE *et al.*, 2014), ou redução na biodisponibilidade do NO que ocorre por reação com espécies reativas de oxigênio (HARRISON, 1997).

Nos vasos, as espécies reativas de oxigênio podem ser geradas por uma variedade de enzimas, tais como xantina oxidases, mieloperoxidases, lipooxigenases, ciclooxygenases, mitocôndria, NOS desacoplada e NADPH oxidases.

O aumento na expressão ou atividade da enzima NADPH oxidase (NOx) na parede dos vasos induz a produção de espécies reativas de oxigênio, e inúmeras evidências acerca da ativação da NOx foram relatadas em modelos experimentais de hipertensão induzida por infusão com angiotensina II, bem como em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (LI, H. *et al.*, 2006). A enzima NADPH oxidase pode ser ativada também por bactérias e metabólitos (glicose, aminoácidos, ácidos graxos e citocinas) (GARCIA *et al.*, 1999).

O efeito da AII sobre a atividade da NADPH sugere que ativação local ou sistêmica do SRAA pode formar EROs e causar disfunção endotelial (GRIENDLING *et al.*, 2000). A angiotensina II (AII) é um dos principais hormônios peptídeos efetores do SRAA e tem papel importante na patogênese das doenças cardiovasculares, como a hipertensão,

aterosclerose e doenças renais, participando do controle da pressão arterial e da homeostasia dos fluidos (WEISS *et al.*, 2001).

Existem pelo menos dois tipos de receptores acoplados à proteína G mais conhecidos, que medeiam as funções da AII, o AT₁ (receptor do tipo-1 para AII) e o AT₂ (receptor do tipo-2 para AII). O receptor AT₁ é expresso predominantemente nas células cardiovasculares, como as células do músculo liso vascular, e sua ativação está associada a processos fisiológicos e patológicos. Através da ativação deste receptor, a AII ativa vias de sinalização citoplasmática que podem contribuir com o remodelamento vascular, incluindo hipertrofia, hiperplasia e migração das células do músculo liso vascular. O receptor AT₁ interage com várias proteínas G, incluindo G_{q/11}, G_i, G₁₂ e G₁₃, e produz segundos mensageiros, como o IP₃, DAG e EROs. Além disso, a AII ativa várias proteínas cinases as quais foram revisadas em detalhes em diversas publicações (SUZUKI, H. *et al.*, 2005; TOUYZ; SCHIFFRIN, 2000).

Além das proteínas cinases a AII por meio do receptor AT₁ ativa também proteínas G pequenas, como a Ras, Rho e Rac (OHTSU *et al.*, 2006). Essas proteínas G pequenas parecem estar envolvidas no remodelamento vascular induzido pela AII. A Rac participa do remodelamento vascular e está relacionada à redução do complexo NADPH oxidase para produzir EROs por ativação da AII, nas células do músculo liso vascular (GREGG *et al.*, 2003). A Rho está relacionada à sensibilização ao Ca²⁺ na contração do músculo liso vascular, e evidências mostram que a via RhoA/ROCK também está relacionada ao remodelamento vascular promovido por ação da AII (OHTSU *et al.*, 2006).

A função da AII nas células endoteliais através da ativação de receptores AT₁ está relacionada ao equilíbrio entre o NO e EROs (WATANABE, T. *et al.*, 2005). Redução na biodisponibilidade do NO, leva à vasoconstrição, proliferação das células do músculo liso vascular e inflamação. Como já mencionado o declínio de NO pode ser causado por redução na expressão da NOS-III, falta de substrato ou cofator para a NOS-III e, alterações na sinalização celular onde a NOS-III não é ativada corretamente, como no estado de desacoplamento da NOS-III (CAI; HARRISON, 2000). A Figura 4 ilustra a produção de NO e EROs pela ação AII em receptor AT₁ nas células endoteliais. A produção de NO requer ativação da proteína G_q e fosforilação da NOS-III na Ser¹¹⁷⁹ (SUZUKI, H. *et al.*, 2006). Por outro lado, a NOS-III pode vir a ser desacoplada pela AII, formando ânion superóxido no lugar de NO (MOLLNAU *et al.*, 2002; YAN *et al.*, 2003).

consequentemente, o estresse oxidativo pode levar a sua oxidação excessiva e depleção (LAURSEN *et al.*, 2001; MILSTIEN; KATUSIC, 1999). O equilíbrio entre a geração de EROs, NO e peroxinitrito nas células endoteliais e no músculo liso vascular podem ser um determinante importante da função patológica da AII na disfunção endotelial.

A integridade do endotélio depende da extensão do dano e da capacidade endógena da reparação do mesmo. O endotélio pode ser reparado por dois mecanismos propostos. Células endoteliais maduras adjacentes podem se replicar localmente e substituir as células danificadas ou que foram perdidas, e células progenitoras endoteliais circulantes, que são recrutadas da medula óssea para a circulação periférica e podem se diferenciar em células maduras com características endoteliais (ASAHARA *et al.*, 1997). A mobilização destas células é, ao menos em parte, dependente de NO (AICHER *et al.*, 2003).

Outros fatores que demonstram uma melhora na função endotelial e na biodisponibilidade de NO são a prática regular de exercícios físico e alguns medicamentos, como por exemplo, as estatinas, usadas no tratamento da hipercolesterolemia prevenindo a aterosclerose (LAUFS *et al.*, 2004; VASA *et al.*, 2001; WALTER *et al.*, 2002). De fato, há consenso de que diversos fármacos podem auxiliar na redução da disfunção endotelial. Existem vários medicamentos que são doadores de NO, sendo que os mais conhecidos são os nitratos e nitritos orgânicos, classe onde se inclui a nitroglicerina, famosa por seu uso no tratamento da angina (KATSUKI *et al.*, 1977).

Outra estratégia para melhorar a função endotelial é aumentar a biodisponibilidade do NO, o que pode ocorrer pela estimulação da produção endógena pelas NOS, o que pode ser feito com o uso de substratos da NOS, cofatores, ou com drogas que ativam a própria NOS ou compostos que interfiram na via que reduz a atividade da NOS. Essas estratégias, entretanto, continuam em fases experimentais de busca, desenvolvimento e/ou validação. Os antioxidantes e bloqueadores do SRAA parecem aumentar a síntese de NO, por meio de fosforilação da NOS-III (MOUNT *et al.*, 2007). O telmisartan, um antagonista de receptores AT₁ de AII, promove redução da disfunção endotelial por meio da ativação da NOS-III via fosforilação de sítios específicos em resíduos de serina¹¹⁷⁷ e serina⁶³⁵ (BOHM, 2007).

Fatores genéticos também estão relacionados à integridade do endotélio. Estudos em genética populacional indicam uma importante associação entre o polimorfismo do

gene da NOS-III com doença arterial coronariana e hipertensão arterial (HINGORANI *et al.*, 1999; LACOLLEY *et al.*, 1998; MIYAMOTO *et al.*, 1998; SHIMASAKI *et al.*, 1998). Apesar da grande variedade genética encontrada para o gene da NOS-III, a correlação entre genótipo e fenótipo clínico varia quantitativa e qualitativamente, mostrando que ainda existe uma associação inconsistente entre o polimorfismo e o fenótipo (WANG; WANG, 2000). Esta inconsistência ou variedade tem sido atribuída a fatores ambientais. A importância dos fatores ambientais na gênese de doenças cardiovasculares reflete-se nas diferenças de morbidade e mortalidade encontrada entre os grupos geneticamente homogêneos, porém com estilos de vida diferentes.

Efeito da dieta com sal e frutose na função cardiovascular

O consumo excessivo de sal vem sendo muito estudado e já está bem demonstrado como fator que predispõe ao desenvolvimento de hipertensão (DOS SANTOS *et al.*, 2006; HE *et al.*, 2011). Este consumo vem aumentando, chegando a ser de 9 a 12 g por dia (BROWN, I. J. *et al.*, 2009). Em pesquisa publicada recentemente (MOZAFFARIAN *et al.*, 2014), estimou-se que em 2010 ocorreram 1,65 milhão de mortes no mundo por doenças cardiovasculares, atribuídas ao consumo de sal acima dos níveis recomendados pela OMS, que é de 2 g por dia.

Este aumento no consumo de sal pelos seres humanos é relativamente recente em termos evolucionário, e representa um desafio para o organismo, que precisa excretar essas quantidades elevadas de sódio pelos rins. A evolução para a vida terrestre significou deixar para trás o mar e sua fonte contínua de sal e água. O nosso organismo teve que desenvolver um mecanismo para preservar a salinidade e ser capaz de manter esse ambiente interno e o equilíbrio osmótico. Assim, os rins se tornaram os responsáveis pela regulação do equilíbrio de sal e água, conservando ambos em períodos de privação e excretando uma urina mais diluída quando o consumo de água é grande (NAGASE, 2010).

O equilíbrio entre a ingesta de sal e a sua excreção é fundamental para o controle do volume extracelular. Quando o consumo de sal é elevado ocorre retenção de sódio e água e, conseqüentemente, aumento do volume extracelular. Esse aumento no volume é

o gatilho para acionar mecanismos compensatórios que aumentam a excreção urinária de sódio, mas que mantém uma retenção continuada de água (HE *et al.*, 2011).

Estudos epidemiológicos, experimentais, bem como ensaios clínicos, fornecem evidências de um efeito prejudicial da ingestão elevada de sal com aumento da pressão arterial (ELLIOTT *et al.*, 2007; GRAUDAL *et al.*, 1998; SACKS *et al.*, 2001). Autores sugerem que esse efeito deletério do sal pode ser decorrente do aumento na produção basal de ânion superóxido (ZICHA *et al.*, 2001), e aumento na produção e atividade de AII (DOS SANTOS *et al.*, 2006), um vasoconstritor considerado o maior mediador do remodelamento vascular (HIGUCHI *et al.*, 2007).

O consumo de alimentos industrializados resultou em aumento significativo no consumo de sal e mais recentemente aumento no consumo de açúcares, incluindo a frutose. O açúcar de mesa (sacarose) é um dissacarídeo composto por uma molécula de frutose e uma de glicose.

A frutose é um monossacarídeo presente nas frutas, vegetais e mel (JOHNSON *et al.*, 2009), sendo por isso muitas vezes considerada pela população em geral como um produto desprovido de efeitos deletérios. A prática do uso da frutose em alimentos industrializados teve início na década de 70 em parte pelo baixo custo da frutose frente ao açúcar extraído da cana-de-açúcar e por se misturar facilmente ao alimento processado, aumentando assim sua palatabilidade (BRAY *et al.*, 2004).

Apesar da similaridade na estrutura química ($C_6H_{12}O_6$), frutose e glicose são metabolizadas de maneiras completamente diferentes e utilizam diferentes transportadores (ZHAO; KEATING, 2007). O metabolismo da frutose difere da glicose e ocorre de maneira independente de insulina. No intestino delgado a frutose, seja aquela proveniente da ingestão de frutose pura, ou da digestão da sacarose, é lentamente transportada do lúmen intestinal para o citosol do enterócito através do transportador GLUT5, que predominantemente transporta a frutose. O GLUT5 localiza-se na parte apical do enterócito e é expresso abundantemente também no túbulo proximal dos néfrons, especificamente no segmento S3 (HELLIWELL *et al.*, 2000). O transporte específico da frutose nesta fase através do GLUT5 não requer hidrólise de ATP (trifosfato de adenosina). Uma vez dentro do enterócito a frutose difunde-se para a circulação sanguínea via outro transportador, o GLUT2, localizado na parte basolateral do enterócito, que transporta frutose ou glicose (DOUARD; FERRARIS, 2013). Dessa

maneira, uma grande quantidade de frutose chega ao fígado (HAVEL, 2005), via transportador GLUT2, onde sofre metabolismo de primeira passagem pela ação de uma enzima altamente seletiva para frutose, a frutocinase-C, que é expressa no fígado, intestino delgado e rim de humanos e animais de laboratório (CHEESEMANN, 1993). Essa etapa do metabolismo da frutose, diferentemente do que ocorre para a glicose, não possui um sistema de *feedback* negativo e pode gerar depleção de ATP, ocorrendo a formação de AMP (monofosfato de adenosina) que, por sua vez, é metabolizado pela AMP deaminase produzindo ácido úrico dentro das células (DIGGLE *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2009). A ação da frutocinase-C sobre a frutose tem como produto o gliceraldeído e o fosfato de diidroxiacetona, que podem convergir rapidamente para a via glicolítica ou de glicólise. A glicose tem seu metabolismo regulado negativamente pela fosfofrutocinase. Dessa maneira a frutose pode entrar de forma contínua na via glicolítica, o que resulta em uma grande produção de triglicerídeos (MAYES, 1993), levando ao acúmulo de lipídeos no fígado (BERGHEIM *et al.*, 2008). A Figura 5 ilustra as diferenças entre o metabolismo da frutose e da glicose no hepatócito.

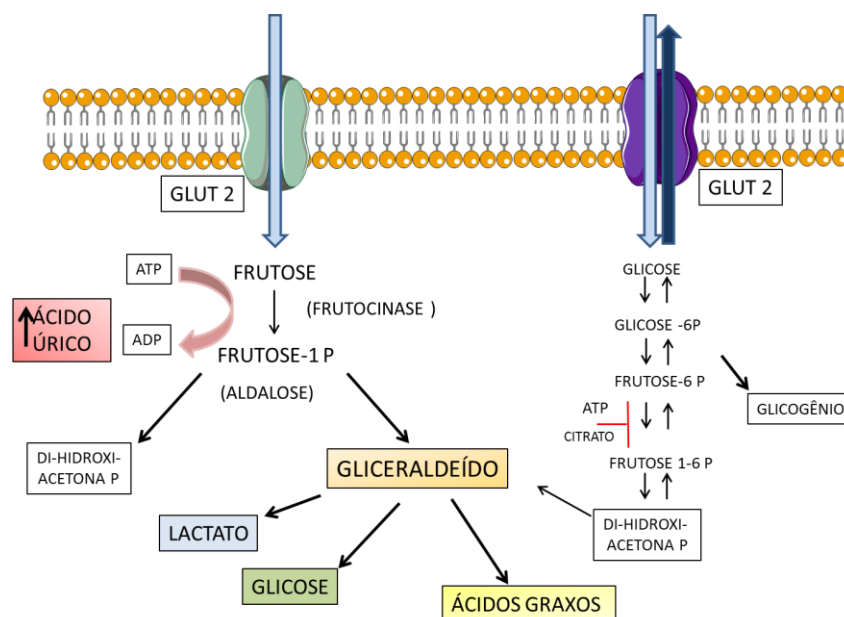


Figura. 5 Esquema resumido do metabolismo hepático da frutose. A frutose é transportada para o fígado via GLUT2, onde é rapidamente metabolizada. O metabolismo da glicose é regulado pelo ATP e citrato, de acordo com a necessidade energética das células, já o metabolismo da frutose não possui etapa reguladora, e independe da insulina, podendo ocorrer depleção do ATP, aumento na produção de ácido úrico, e formando lactato, glicose e ácidos graxos que são liberados na corrente circulatória. (Adaptado de Tappy e Lê, 2010).

Em 2008 foi feita uma pesquisa sobre o consumo de frutose por humanos e o resultado foi publicado no “The Third National Health Examination Survey” (NHANES) que se trata de um programa de estudos destinado a avaliar o estado de saúde nutricional de adultos e crianças nos Estados Unidos, sendo o único levantamento que combina entrevistas e exames físicos. Os resultados apresentados apontaram que 10% das calorias diárias consumidas pelos norte americano vêm da frutose. Este consumo é de aproximadamente 22 colheres de chá de açúcar por dia, sendo ainda maior entre os adolescentes de 14 a 18 anos, faixa da população em que o consumo chega a ser de 34 colheres de chá de açúcar/dia (VOS *et al.*, 2008). Esse consumo tão alto é proveniente principalmente do consumo elevado de refrigerantes e doces (JOHNSON *et al.*, 2009; RIZKALLA, 2010).

Por muitos anos os seres humanos consumiram de 16 a 20 g de frutose por dia, em grande parte pelo consumo de frutas frescas. Atualmente este consumo chega a ser de 85-100 g/dia (BASCIANO *et al.*, 2005; BRAY *et al.*, 2004). Estudos mostram que a sobrecarga de frutose em ratos leva a alterações agudas como hiperuricemia transitória, ativação do sistema nervoso central e estresse oxidativo, que podem levar a episódios de hipertensão. Porém, vale ressaltar que isso tem sido demonstrado em modelos experimentais que utilizam 60% de frutose adicionada à dieta. Nesses estudos é comum a demonstração de alterações metabólicas e cardiovasculares severas, incluindo dislipidemia, resistência à insulina, ganho de peso e hipertensão arterial (HAVEL, 2005). Em geral, esses estudos apontam que o consumo constante de altas quantidades de frutose gera alterações crônicas nos vasos, que incluem a disfunção endotelial, nos rins induzindo vasoconstrição e aumento na absorção de sódio, e no intestino, causando aumento da absorção de sódio e água (NAKAGAWA *et al.*, 2006; SANCHEZ-LOZADA *et al.*, 2007; SANCHEZ-LOZADA *et al.*, 2005).

Apesar de ser um modelo bastante utilizado para o estudo de efeitos do consumo excessivo de frutose, estes valores de 60% de frutose na dieta não são realistas quando aplicados à população humana, pois é o equivalente a 300 g/dia de frutose em um consumo de 2500 kcal/dia. Por isso, os dados obtidos em estudos com tamanha sobrecarga de frutose (até 60%) precisam ser analisados e interpretados com cautela,

quando da extrapolação dos resultados obtidos com animais de laboratório para humanos (TAPPY *et al.*, 2010).

O aumento no consumo de sal ou de frutose e sua associação à hipertensão chamou a atenção de estudiosos e autoridades da Saúde Pública para a dieta como fator capaz de elevar ou predispor à elevação da pressão arterial. Entretanto, não se sabe como esses fatores, uma vez associados à dieta, contribuem para o desenvolvimento e manutenção da HAS. Por isso a hipótese deste estudo foi de que a combinação de dieta elevada de sal, associada à dieta moderada² de frutose, poderia potencializar efeitos deletérios ao sistema cardiovascular, promover alterações estruturais e funcionais nos vasos sanguíneos e elevar a pressão arterial.

² No contexto deste estudo, entenda-se moderada como acima do usual ou recomendado, porém abaixo das quantidades excessivamente altas por vezes utilizadas em estudos encontrados na literatura.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se a exposição precoce de ratos à dieta acrescida de NaCl (4%) e/ou frutose (6%) gera alterações funcionais no sistema cardiovascular, e determinar quais vias de transdução estariam associadas a essas modificações.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o efeito da ingesta crônica de ração acrescida de NaCl (4%) e/ou frutose (6%) sobre o consumo alimentar, hídrico e o ganho de peso;
- b) Determinar o efeito da dieta NaCl (4%) e/ou frutose (6%) no volume urinário e na função renal;
- c) Investigar possíveis alterações hematológicas geradas pela dieta acrescida de NaCl (4%) e/ou frutose (6%);
- d) Avaliar se o consumo crônico da dieta acrescida de NaCl (4%) e/ou frutose (6%) geram alterações no peso relativo da aorta, do rim e do coração;
- e) Verificar o efeito do consumo crônico de ração acrescida de NaCl (4%) e/ou frutose (6%) sobre a pressão arterial média e verificar o efeito da dieta sobre a reatividade vascular sistêmica para agentes vasoativos;
- f) Estudar o efeito da dieta NaCl (4%) e/ou frutose (6%) sobre a pressão arterial sistêmica e frequência cardíaca em ratos acordados sem o efeito de anestésicos;
- g) Investigar se a dieta NaCl (4%) e/ou frutose (6%) geram alterações na reatividade vascular renal *in vitro*;
- h) Avaliar se o consumo de ração NaCl (4%) e/ou frutose (6%) promovem alterações na reatividade vascular do leito arterial mesentérico *in vitro*;
- i) Determinar se a dieta frutose (6%) pode alterar a reatividade vascular de anéis de aorta frente a agentes vasodilatadores e vasoconstritores;
- j) Estabelecer se a dieta frutose (6%), em modelo funcional e molecular pode modificar a homeostasia do cálcio intracelular e extracelular e da via de sensibilização ao cálcio na regulação do tônus vascular em anéis de aorta;

- k) Estudar a influência da dieta frutose (6%) na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), bem como na atividade de enzimas antioxidantes em aorta de ratos;

3. MATERIAL

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos, da linhagem *Wistar*, provenientes do biotério do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), mantidos em temperatura de 21 ± 1 °C e ciclo claro/escuro de 12/12 h. Todos os procedimentos foram submetidos à avaliação e aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná, protocolo de número 601.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Como abordado na introdução deste documento, diversos estudos têm indicado que alguns hábitos alimentares contribuem para o desenvolvimento e/ou agravamento de doenças cardiovasculares.

Para avaliar o efeito da ingesta crônica de NaCl (4%) e frutose (6%), assim como de sua associação, utilizamos a ração padrão farelada produzida pela Nuvilab (NUVILAB® CR-1, Curitiba, Brasil), adicionada de NaCl (4%) (Vetec Química, Rio de Janeiro, Brasil), e/ou frutose (6%) (Wow Nutrition, Caçapava, Brasil), ou ambas.

A exposição à dieta com quantidades elevadas de sódio, frutose ou sal/frutose foi realizada em ratos *Wistar*, iniciando-se no vigésimo primeiro dia de vida dos animais, ou seja, no dia do desmame. No mesmo dia os ratos foram separados randomicamente em 4 grupos, os quais passaram a receber ração padrão (grupo controle, CT), ou ração enriquecida com cloreto de sódio (4%) (grupo NaCl 4%), ou a ração enriquecida com NaCl 4% + frutose 6%, (grupo NaCl 4%/frutose 6%), ou ração enriquecida de frutose 6% (grupo Frutose 6%), conforme esquema ilustrativo apresentado na Figura 6. Até a realização dos experimentos, os animais tiveram livre acesso à ração e água.

O preparo da ração seguiu o seguinte protocolo: a ração farelada foi pesada e adicionada de sal e/ou frutose nas proporções descritas anteriormente. Para garantir a homogeneidade das rações preparadas e evitar a presença de aglomerados de ração, sal ou frutose, a mistura foi peneirada duas vezes durante o preparo dos ingredientes. Em seguida foi adicionada água filtrada e a ração farelada foi peletizada mecanicamente e colocada em estufa com ventilação forçada, em temperatura de ~60 °C por 24 h, garantindo-se a secagem completa dos peletes para evitar a fermentação e proliferação de fungos no seu interior, sem perda de nutrientes, principalmente de vitaminas e outros compostos, decorrentes do excesso de umidade.

Vale ressaltar que a adição das quantidades de sal (4%) e ou frutose (6%) utilizadas não modificaram a textura ou a coloração da ração preparada, em relação à servida aos animais do grupo controle (ração padrão). A quantidade de sal ou de frutose adicionados à dieta não foi suficiente para reduzir significativamente a proporção dos outros nutrientes presentes na ração.

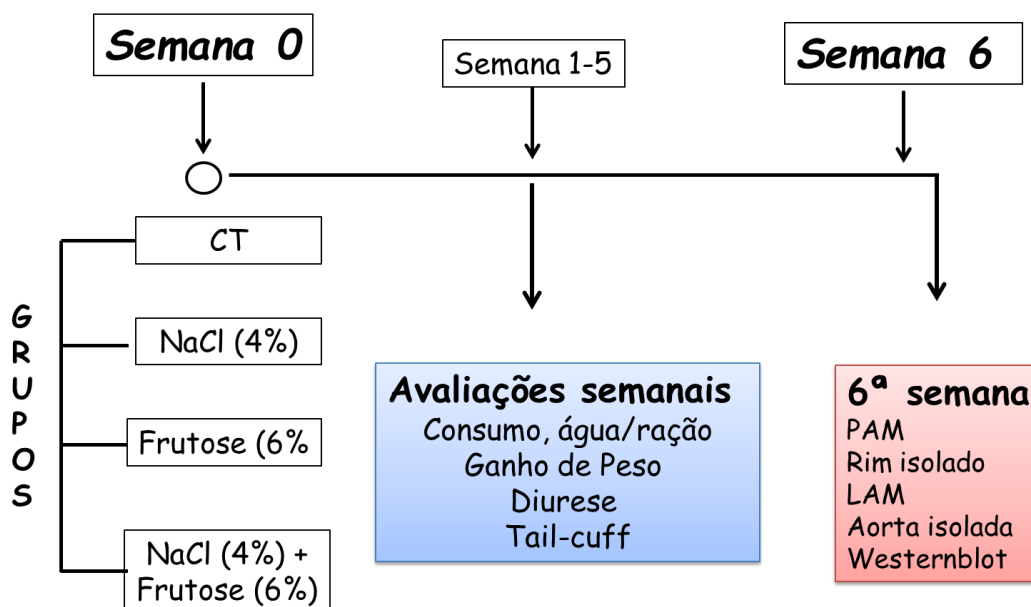


Figura 6. Representação esquemática do desenho experimental. No 21^a dia de vida (desmame) ratos *Wistar* foram divididos randomicamente nos seguintes grupos: Grupo CT – exposto à ração padrão; Grupo frutose 6% – tratado com ração padrão contendo 6% de frutose; Grupo NaCl 4% – tratado com ração padrão adicionada de 4% de NaCl; Grupo NaCl 4%/ Frutose 6%/ – exposto à dieta adicionada de sal (4% NaCl) mais (6% frutose). Pressão arterial média (PAM), leito arterial mesentérico (LAM). Os animais foram tratados (*ad libitum*) com as rações padronizadas e adicionadas de NaCl (4%) e/ou frutose (6%) durante 42 dias (6 semanas).

3.3 DROGAS E SAIS

Para a execução dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes drogas e sais: acetilcolina, nitroprussiato de sódio (ambos da Merck; Darmstadt, Alemanha) fenilefrina, N- ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), superóxido dismutase, apocinina, tempol, Peg-catalase, atropina, 4-aminopiridina (4-AP), tetraetilamônio (TEA), glibenclamida, isoproterenol, bradicinina, angiotensina I e II, cafeína, carboxi-PTIO, 1400w, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) (todos da Sigma-Aldrich Chemical, EUA), composto Y-27632 ((R)-(+)-trans-4-(1-aminoetil)-N-(4-piridinil)ciclohexanocarboxamida) (Tocris, Yokohama, Japão), heparina (Cristália, SP, Brasil), xilazina e cetamina (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil). As soluções estoque de bradicinina, angiotensina I e II foram dissolvidos em ácido clorídrico (HCl 0,1 N), glibenclamida e ODQ foram dissolvidos em dimetil sulfóxido (DMSO) e indometacina em bicarbonato de sódio (0,5%). Antes da utilização foram diluídos em solução salina (0,9%) ou solução de PSS, antes da utilização nos experimentos. Contendo a seguinte composição (em mM); Cloreto de sódio 118 (NaCl), cloreto de cálcio 2,5 (CaCl₂), cloreto de potássio 4,7 (KCl), sulfato de magnésio 1,2 (MgSO₄), dihidrogenofosfato de potássio 1,2 (KH₂PO₄), bicarbonato de sódio 25 (NaHCO₃), D-Glucose 10 (ALTURA; ALTURA, 1980; ZHANG, A. *et al.*, 1992; ZHANG, A. *et al.*, 1993) e EDTA (ácido etilenoglicol bis(2-aminoetileter tetra acético) (Merck; Darmstadt, Alemanha).

3.4 REAGENTES

Foram utilizados os seguintes reagentes: ditionitrobenzaldeído (DTNB; Fischer Scientific, Ottawa, ON, CA), triton X-100 (Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). Acrilamida, Tris-HCl, dodecil sulfato de sódio (SDS), persulfato de amônio (APS), tetrametiletilenodiamina (TEMED), reagente para extração de proteína tecidual (T-PER), fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF), o-vanadato. (BioRad, Hercules, CA, EUA). Tris-glicina, tween-20, brometo hexadeciltrimetilamônio (HTAB), ácido ditionitrobenzóico (DTNB), glutathione (GHS), xilenol, butihidroxitolueno (BHT), sulfato ferroso, pirogallol, fosfato dipotássico, 2,4-dinitroclorobenzeno (CDNB), α -naftil, sulfanilamida.

3.5 ANTICORPOS

Os anticorpos para Ca-ATPase tipo 2 (SERCA2), Rho-A, ROCK I, foram adquiridos da Cell Signalling Technology (Danvers, MA, EUA).

4. METODOLOGIAS

4.1 Avaliação do consumo alimentar e hídrico e do ganho ponderal

Ao longo dos tratamentos descritos no item 3.2 (Figura 6) os animais foram pesados no dia do desmame e semanalmente durante todo o período de tratamento, mantidos em caixas com 5 animais, sendo a última pesagem realizada no dia do experimento (6ª semana) no qual foram feitos os experimentos. Para isso utilizamos uma balança digital com precisão de 1 g.

O consumo de ração e água foram avaliados semanalmente em um conjunto de experimentos realizados neste estudo (n = 5). O consumo de ração foi calculado através da diferença entre a quantidade de ração ofertada e a ração remanescente nas gaiolas. O consumo de água foi avaliado da mesma forma, sendo medido com o auxílio de provetas graduadas. Tanto a ração como a água foram ofertados *ad libitum*. A ração foi pesada nos dias de troca das caixas dos animais, e a água mensurada sempre que havia necessidade de reposição da mesma.

4.2 Avaliação da diurese, pH e densidade da urina

Para mensuração do volume urinário, os animais dos grupos experimentais descritos no item 3.2 foram colocados em gaiolas metabólicas individuais por um período de 8 h. A urina coletada teve seu volume registrado nos tempos de 1, 2, 4, 6, e 8 h. A excreção cumulativa da urina foi calculada em relação ao peso corporal e expressa como ml/100 g de peso corporal. O pH foi determinado nas amostras de urina imediatamente após a coleta usando-se um pH-metro (HI-8424, Hanna Instruments). A densidade foi determinada pelo peso da amostra em balança analítica (Mettel AE 163). O pH e a densidade foram determinados em cada amostra de urina coletada durante o período.

4.3 Avaliações bioquímicas e parâmetros hematológicos

Durante o preparo dos experimentos descritos nos itens 4.7 ou 4.8 o sangue dos animais foi retirado através da aorta abdominal. Aproximadamente 1 ml do sangue coletado foi armazenado em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético disódico (EDTA) a 5% e submetidos a análise em contador hematológico automatizado (modelo Horiba, ABX®, Micros 60, Montpellier, França). Os resultados foram expressos em valores absolutos, com exceção do hematócrito que foi expresso em porcentagem. Outra parte do sangue coletado (~1000 µl) foi acondicionada em tubos contendo anticoagulante (40 µl de EDTA para 1 ml de sangue), os quais foram centrifugados a (3300 rpm, 10 minutos, 4 °C) para separação do plasma. As amostras de plasma foram aliquotadas e armazenadas em freezer a -80 °C até a realização das dosagens. As concentrações plasmáticas de ácido úrico e creatinina foram determinadas através de kits comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil). Os níveis de glicose foram acessados na sexta semana, com sangue colhido da cauda do animal e analisado no mesmo instante através da utilização de um monitor de glicemia, ACCU-CHEK (Roche, Mannheim, Germany).

4.4 Avaliações macroscópicas da aorta torácica, do rim e do coração dos animais

Ao término dos experimentos descritos nos itens 4.7 ou 4.8 a aorta, rim esquerdo e coração foram cuidadosamente retirados. Em balança analítica (modelo AY220, Shimadzu, Japão) foram determinados o peso da aorta torácica (com completa remoção do tecido conectivo), rim (excluindo a glândula supra-renal e tecido adiposo adjacente) e coração (após a separação completa dos átrios e grandes vasos, permanecendo somente os ventrículos). Os resultados foram expressos como peso do tecido por 100 g de peso do animal. O rim esquerdo foi pesado imediatamente após a remoção e colocado em estufa por 24 h a 30 °C, para desidratação e determinação do peso úmido e seco.

4.5 Medidas da pressão arterial pelo método direto em ratos anestesiados

Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), administrada pela via intramuscular e suplementada a intervalos de 45-60 minutos ou quando foi necessário. Após obtenção do estado de anestesia profunda, os animais foram acomodados em decúbito ventral, a veia femoral esquerda foi localizada e dissecada para inserção de uma agulha conectada a um cateter de polietileno (PE 10) destinado à administração das drogas e soluções empregadas neste estudo. Imediatamente após a canulação da veia femoral, 30 UI de heparina (diluída em 100 µl de solução salina isotônica) foram administradas para prevenir a formação de coágulos e consequente obstrução das cânulas. Todos os animais foram submetidos à traqueostomia e mantidos sob-respiração espontânea.

A artéria carótida esquerda de cada animal foi localizada e cuidadosamente isolada do nervo vago e tecidos adjacentes. Com auxílio de linha de sutura, o fluxo sanguíneo da artéria carótida foi interrompido na altura de sua extremidade distal, enquanto o fluxo em sua extremidade proximal foi temporariamente suprimido pela compressão com uma pinça curva. Utilizando-se uma tesoura oftalmológica, um pequeno corte foi realizado na região medial da porção da artéria carótida clampeada, servindo como via para inserção de um cateter de polietileno (PE 20), devidamente heparinizado, que foi firmemente conectado à artéria e destinou-se à mensuração contínua da pressão arterial.

Ao final dos experimentos, todos os animais foram eutanasiados através de uma overdose de tiopental (superior a 40 mg/Kg, i.v.). Os registros foram obtidos por meio de transdutores de pressão acoplados a um amplificador de sinais (Modelo ML 130, AD Instruments, Austrália) conectados a um computador contendo um software específico de integração (Chart v7.00, PowerLab, AD Instruments, Austrália).

Protocolo experimental

Após o procedimento cirúrgico foi aguardado um período de estabilização de 15 a 20 min. Em seguida foi registrada a pressão arterial basal, antes da administração de quaisquer drogas. Os agentes vasoativos foram administrados por via intravenosa, com intervalos de 10 min entre as doses, sendo que cada animal foi exposto à apenas um agente. Foram administradas as seguintes drogas, fenilefrina (6, 20 e 60 nmol/kg), ou angiotensina I (6, 20 e 60 pmol/kg), ou angiotensina II (6, 20 e 60 pmol), ou vasopressina (2, 6 e 20 pmol/kg), ou acetilcolina (6, 20 e 60 nmol/kg), ou bradicinina (6, 20 e 60 nmol/kg). Os efeitos hipertensivos e hipotensivos desses agentes foram avaliados e comparados entre os grupos experimentais descritos no item 3.2. As doses utilizadas para cada droga foram selecionadas de acordo com trabalhos previamente publicados (DE SOUZA *et al.*, 2011).

4.6 MEDIDAS DA PRESSÃO ARTERIAL VIA PLETISMOGRAFIA (TAIL-CUFF)

Esses experimentos foram realizados em animais dos grupos CT, NaCl 4%, Frutose 6% e NaCl 4%/Frutose 6%, na quarta, quinta e sexta semanas do período de exposição às rações. A medida da pressão arterial sistólica (PAS) pelo método de medida na cauda foi realizada por pletismografia (AD Instruments, Austrália). Para diminuir o estresse da contenção necessária para a medida da pressão arterial os animais dos grupos NaCl 4%, Frutose 6%, NaCl 4%/Frutose 6% e controle foram treinados para adaptação do equipamento na semana anterior à primeira medida da pressão arterial. Após a adaptação em sala aquecida a 28-30 °C os animais foram acondicionados em tubos acrílicos de contenção e acomodados sobre placa aquecida. O transdutor previamente calibrado (modelo LE5160R, Panlab, Espanha), foi colocado na cauda do animal. O transdutor foi conectado a um esfigmomanômetro dotado de sistema de insuflação automatizado, o qual é acoplado a um sistema de captação (modelo ML125 NIBP) e de conversor de dados (Power LAB 8/35), conectado a um computador e software específico de aquisição de dados (LabChart v.7.1; Todos da AD Instruments, Austrália). Foram realizadas de 3 a 5 medidas por animal, em intervalos de 3 a 5 minutos.

4.7 RIM ISOLADO

Procedimento cirúrgico para isolar o rim

Para evitar o aparecimento de coágulos no leito vascular renal durante o procedimento de isolamento e perfusão do rim, os animais foram previamente tratados com heparina (30 U.I., i.p.), 5 a 10 minutos antes da administração do agente anestésico.

Os animais foram submetidos a anestesia com uma mistura de cetamina/xilazina (100/20 mg/kg, i.p.) antes do procedimento cirúrgico. Após a obtenção de anestesia profunda uma laparotomia foi realizada, permitindo o acesso a todas as vísceras do animal. Em seguida, o intestino foi cuidadosamente deslocado para o lado direito, permitindo a visualização do rim esquerdo e dissecação da artéria aorta abdominal. Durante estes procedimentos as vísceras e, especialmente o rim esquerdo, foram mantidos umedecidos com uma gaze cirúrgica embebida em solução salina fisiológica (PSS; composição descrita no item 3.3). Com o auxílio de um fio cirúrgico o ureter esquerdo foi ligado³, impedindo o fluxo urinário e, conseqüentemente, a produção de urina pelo rim. Outro fio cirúrgico foi posicionado na artéria aorta abdominal, entre a artéria renal direita e a esquerda, para direcionar o fluxo sanguíneo somente para o lado esquerdo. O fluxo sanguíneo na artéria aorta foi interrompido abaixo da artéria renal direita, sendo que em nenhum momento o rim esquerdo foi exposto a qualquer processo isquêmico. Em seguida, um pequeno corte foi realizado na artéria aorta, permitindo a inserção de um cateter que foi direcionado até as proximidades da artéria renal esquerda e fixado à artéria aorta com o auxílio de fios cirúrgicos. O fio cirúrgico anteriormente posicionado na artéria aorta abdominal foi ligado, interrompendo o fluxo renal, e a bomba peristáltica de perfusão foi acionada imediatamente, iniciando-se o processo de perfusão. O rim, em processo contínuo de perfusão, foi removido da cavidade abdominal e acomodado em placa de Petry para retirada da gordura adjacente e da glândula supra-renal a fim de evitar a influência da adrenal sobre o leito vascular renal durante o período de experimentação. Em seguida, o rim foi acondicionado em uma cuba contendo 100 ml de PSS, e acoplado ao sistema de perfusão, mantido à temperatura de 37 °C,

³ A obstrução do ureter garante a obtenção de um rim não funcional, porém o sistema vascular perfeitamente responsivo durante um período de 3 h, tempo suficiente para a realização dos protocolos experimentais.

constantemente aerado com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) sob um fluxo constante de 4 ml/min desta mesma solução. Um período de 1 hora foi respeitado antes do início da avaliação experimental. O registro da pressão de perfusão foi feito através de um transdutor de pressão acoplado ao sistema de perfusão, interligado a um polígrafo computadorizado (LabChart v7.00 AD Instruments, Austrália).

O sistema de perfusão utilizado para avaliação de respostas do leito vascular renal (e mesentérico, descrito no item 4.8.) a agentes vasoativos consistem em; i) um sistema de aquecimento, o qual é composto por banho-maria mantido a 37 °C e associado a uma bomba d'água portátil; ii) uma bomba peristáltica com um sistema de controle da velocidade de solução nutritiva; iii) um transdutor de pressão; iv) uma cuba de 100 ml para órgão isolado, na qual o rim ou o leito mesentérico ficaram mergulhados em solução nutritiva aquecida durante todo o período de experimento e; v) uma cuba de vidro dotada de um sistema de cata-bolhas, de uma serpentina para o aquecimento da solução nutritiva utilizada para a perfusão e ainda três diferentes saídas, a primeira para a perfusão do rim, a segunda para a conexão com o transdutor de pressão e a terceira para a injeção de drogas no sistema.

A velocidade de perfusão mantida pela bomba peristáltica durante todo o experimento foi de 4 ml/min (valor previamente determinado no laboratório e similar ao descrito na literatura).

Protocolo experimental

Após o período de estabilização de 1 h, uma primeira exposição à fenilefrina (30 nmol) foi realizada através da injeção deste composto no sistema de perfusão, para verificação da integridade da resposta. Aguardamos um período de 10 min e a integridade do endotélio foi verificada com a adição de fenilefrina (300 nmol) seguida por acetilcolina (300 nmol). Um novo período de 20 min foi aguardado e foram administradas drogas vasoativas com intervalo de aproximadamente 10 min entre as doses, sendo administrada uma droga por rim. Foram avaliadas as respostas para a fenilefrina (0,1, 1, 3, 10, 30, 100 e 300 nmol) e vasopressina (0,1, 1, 3, 10, 30, 100 e 300 pmol), sendo os efeitos obtidos entre os grupos experimentais descritos no item 3.2 comparados entre si.

4.8 Avaliação da reatividade do leito arterial mesentérico

Procedimento cirúrgico

Os animais foram submetidos a anestesia profunda induzida pela mistura cetamina/xilazina (100/20 mg/kg, i.p.) antes do procedimento. Após a laparotomia o leito mesentérico foi rapidamente isolado e preparado para a perfusão como descrito previamente no item 4.7 (KAWASAKI *et al.*, 1991; KAWASAKI *et al.*, 1988). A artéria mesentérica superior foi canulada e lavada delicadamente com solução salina fisiológica (composição descrita no item 3.3, PSS) para eliminar o sangue de seu interior. O leito arterial mesentérico foi delicadamente separado do intestino e leito venoso, sendo acondicionado em cuba de vidro contendo líquido nutritivo a 37 °C aerado com mistura carbogênica (O₂ 95 % e CO₂ 5 %), e perfundido sob um fluxo constante de 4 ml/min com PSS por meio de uma bomba peristáltica. Mudanças na pressão de perfusão foram determinadas através de um transdutor de pressão conectado a um amplificador de sinais (Modelo ML 130, AD Instruments, Austrália) conectados a um computador contendo um software específico de integração (Chart v7.00. PowerLab, AD Instrumentes, Austrália). O sistema de perfusão utilizado foi o mesmo descrito em detalhes no item 4.7.

Protocolo experimental

Depois de aguardado o período de estabilização de 30 min foi administrado uma única dose de fenilefrina (30 nmol) para a verificação da integridade da preparação. Após novo intervalo de 10 min a integridade do endotélio vascular foi avaliada pela administração de acetilcolina (300 nmol) após obtenção do aumento na pressão de perfusão pela adição da fenilefrina (300 nmol). Em seguida verificamos a resposta do leito arterial mesentérico a agentes vasoconstritores por meio de exposição do leito vascular mesentérico à concentrações crescentes não cumulativas de fenilefrina (3, 10, 30, 100 e 300 nmol), ou vasopressina (3, 10, 30, 100 e 300 pmol), com intervalo de 10 min entre as doses. As mudanças na pressão de perfusão foram registradas e as

respostas obtidas nos grupos experimentais descritos no item 3.2., foram analisadas e comparadas.

4.9 MEDIDA DA REATIVIDADE VASCULAR DE ANÉIS DE AORTA ISOLADA DE RATO

Isolamento e montagem em banho de órgãos

Para os registros da tensão isométrica os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (100/20 mg/kg, i.p.). Após obtenção de anestesia profunda foi realizada uma toracotomia e a aorta torácica descendente foi retirada e colocada em placa de Petri contendo solução nutritiva fisiológica previamente aquecida, para remoção cuidadosa dos tecidos conectivos. Em seguida a aorta de cada animal foi seccionada em 6 anéis de aproximadamente 3-5 mm cada. Os anéis foram acondicionados, por meio de hastes metálicas em suporte de acrílico, em cubas de vidro com capacidade máxima de 3 ml contendo solução nutritiva fisiológica constantemente aerada com solução carbogênica (95% O₂/5% CO₂), e mantidos a uma temperatura de 37 °C. Uma das extremidades da haste foi conectada a um transdutor de força, que acoplado a um sistema computadorizado, permitiu o registro das contrações isométricas. A preservação de endotélio funcional foi assegurada na montagem dos experimentos, exceto em alguns protocolos onde o endotélio foi removido delicadamente pela fricção da camada interna da aorta com uma haste metálica.

Os anéis de aorta foram submetidos individualmente a uma tensão basal constante de 1 g durante 60 min, período reservado para a estabilização das preparações antes do início de cada protocolo experimental. Neste período, o líquido nutritivo foi substituído a cada 15 min e a tensão reajustada a 1 g quando necessário.

Após o período de estabilização as preparações foram expostas à solução nutritiva modificada contendo cloreto de potássio (KCl – 60 mM), para verificação da responsividade dos anéis de aorta. Um novo intervalo de 30 min foi aguardado em solução nutritiva fisiológica para reestabilização das preparações. Em seguida foi induzida uma contração vascular pela administração da fenilefrina (agonista seletivo de receptores α_1 -adrenérgico; 1 μ M) e, na fase tônica da contração obtida, foi adicionado a

acetilcolina (agonista muscarínico; 1 μ M), para obtenção do relaxamento, o qual foi utilizado como parâmetro para determinação da funcionalidade do endotélio.

Os registros foram obtidos por meio de transdutores isométricos, acoplados a um amplificador de sinais (Modelo ML 130, AD Instruments, Austrália) conectados a um computador com software específico de integração (Chart v7.00, PowerLab, AD Instruments, Austrália).

4.10 PROTOCOLOS PARA ANÁLISE DA REATIVIDADE VASCULAR

Avaliação da reatividade vascular da aorta para fenilefrina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio

Preparações de aorta, com e sem endotélio funcional, foram obtidas de todos os grupos experimentais descritos no item 3.2. Após a determinação da presença do endotélio um novo período de estabilização foi aguardado. Os anéis de aorta foram expostos a concentrações crescentes e cumulativas (curva concentração resposta - CCR) de fenilefrina (1 nM a 3 μ M). As respostas foram expressas em gramas.

Em outras preparações, as aortas foram pré-contráidas com fenilefrina (1 μ M) e, na fase sustentada da contração, foram expostas a concentrações crescentes e cumulativas de acetilcolina (1 nM a 3 μ M), ou nitroprussiato de sódio (1 nM a 3 μ M), na presença e ausência de endotélio funcional. As diferenças na tensão foram registradas e analisadas e expressas em porcentagem.

Efeito da adição cumulativa de vasoconstritores em anéis de aorta do grupo frutose 6% e controle

Preparações de aorta com e sem endotélio funcional foram obtidas de ratos controle e frutose 6%. Após o período de reestabilização as aortas foram estimuladas em preparações diferentes com adição crescente e cumulativa de angiotensina I (1 nM a 1 μ M), ou angiotensina II (1 nM a 1 μ M), ou vasopressina (1 nM a 1 μ M).

Avaliação da reatividade vascular da artéria carótida para fenilefrina e angiotensina II em aorta do grupo frutose 6% e grupo controle

O isolamento da artéria carótida seguiu o mesmo procedimento descrito para a artéria aorta, mas somente de animais controle e animais expostos a dieta frutose 6%. Os anéis da artéria carótida foram submetidos individualmente a uma tensão basal constante de 1 g, durante 60 min, período reservado para a estabilização das preparações antes do início de cada protocolo experimental. Após a verificação da presença de endotélio funcional e aguardado o tempo necessário para estabilização os anéis de carótida foram expostos à adição cumulativa de fenilefrina (1 nM a 30 μ M), ou angiotensina II (1nM a 30 μ M). Os registros foram obtidos por meio de transdutores isométricos, acoplados a um amplificador de sinais PowerLab 4/30[®] e LabChart Pro v. 7.3.3 ambos da AD Instruments, Austrália.

Determinação da participação da via NO/GCs na reatividade de anéis de aorta do grupo frutose 6%

As preparações de anéis de aorta foram obtidas de ratos expostos à dieta frutose 6% e controle e submetidas aos procedimentos descritos no item 4.9.

Preparações com endotélio vascular funcional foram utilizadas para avaliar a participação da via NO/GCs na reatividade dos anéis de aorta de ratos frutose 6%. Depois de aguardado o período de 45 min para reestabilização as aortas foram pré-incubadas com L-NAME (inibidor não seletivo para NO-Sintase; 100 μ M), ODQ (inibidor da Guanilato Ciclase solúvel; 10 μ M), carboxi-PTIO (um sequestrados de óxido nítrico; 300 μ M), ou 1400W (inibidor seletivo da NOS induzida; 10 μ M), por um período de 30 min. Em seguida, foram adicionadas às cubas concentrações crescentes e cumulativas de fenilefrina (1 nM a 3 μ M). Cada anel de aorta preparado foi exposto somente para uma droga estudada. As diferenças de tensão foram registradas e analisadas.

Efeito da inibição da ciclooxigenase sobre a contração induzida pela fenilefrina

Após o período de estabilização, os anéis de aorta com endotélio funcional dos grupos frutose 6% e controle foram previamente incubados com indometacina (10 μ M) ou ibuprofeno (10 μ M), dois inibidores não seletivos da ciclooxigenase (COX), ou seus veículos. Trinta minutos após a incubação os anéis de aorta foram expostos a concentrações crescentes e cumulativas de fenilefrina (1 nM a 3 μ M). As respostas contráteis foram registradas em gramas de contração, e cada grupo tratado foi comparado com seu controle (veículo).

Estudo da participação do cálcio e da via de sensibilização ao cálcio na reatividade de anéis de aorta do grupo frutose 6%

Para esta parte do estudo utilizamos anéis de aorta com e sem endotélio funcional, preparados e avaliados como descrito no item 4.9. Após avaliação da funcionalidade do endotélio, as preparações foram mantidas em solução fisiológica nutritiva sem adição de cálcio por 30 min. A reatividade vascular foi avaliada com a adição de uma única concentração de angiotensina II (10 μ M), ou cafeína (100 μ M), ou fenilefrina (1 μ M) nas cubas.

Em outro conjunto de experimento as preparações de aorta com e sem endotélio funcional foram mantidas em solução nutritiva sem a adição de cálcio por uma hora, com trocas da solução nutritiva a cada 15 min. Em seguida os tecidos foram expostos a concentrações cumulativas e crescentes de cloreto de cálcio (CaCl_2) (10 μ M a 100 mM).

Em outras preparações as aortas foram mantidas em solução nutritiva com cálcio e sobre a contração mantida com fenilefrina (1 μ M) foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas do composto Y-27632 (inibidor não seletivo da Rho-kinase; 1 nM a 1 μ M). Para avaliar o efeito do composto Y-27632 na contração induzida pela fenilefrina, diferentes anéis de aorta foram incubados com composto Y-27632 (1 μ M) por trinta minutos, antes da adição de concentrações crescentes e cumulativa de fenilefrina (1 nM a 3 μ M).

Efeito dos bloqueadores de canais de K⁺ na contração induzida pela fenilefrina em anéis de aorta de animais do grupo frutose 6% e controle

Para determinar a participação dos canais de K⁺ na hiporreatividade dos anéis de aorta do grupo frutose 6%, depois de aguardado o período de reestabilização e verificação de endotélio funcional (item 4.9), bloqueadores de canais de K⁺ e seus veículos (soluções utilizadas para diluição das drogas) foram incubados por 30 min, antes da adição de concentrações cumulativas e crescentes de fenilefrina (1 nM a 3 µM), com os seguintes bloqueadores de canais de K⁺: glibenclamida (um bloqueador de canal de potássio ATP-dependente; 10 µM); tetraetilamônio (TEA, bloqueador não seletivo de canais de K⁺; 10 mM); 4-aminopiridina (4-AP, bloqueador de canal de K⁺ voltagem-dependente; 1 mM); ou iberiotoxina (IbTx, bloqueador de canal de K⁺ de alta condutância sensíveis ao cálcio; 10 µM).

Efeito dos sequestradores de NO na reatividade em anéis de aorta do grupo frutose 6%

Para o estudo da participação das espécies reativas de oxigênio (EROs) na reatividade vascular, as aortas foram obtidas de ratos frutose 6% e controle. Após a confirmação da presença de endotélio funcional os anéis de aorta foram incubados com apocinina (inibidor da enzima NADPH oxidase; 0,1 mM), ou superóxido dismutase (SOD, 150 U/mL), ou tempol (sequestrador de ânions superóxido; 0,3 mM), ou catalase (PEG-catalase; 150 U/mL), ou seus veículos (soluções de preparo das drogas). Após trinta minutos de exposição aos inibidores, os anéis de aorta foram expostos a concentrações crescentes e cumulativas de fenilefrina (1 nM a 3 µM), para a obtenção da contração, e as respostas foram expressas em gramas.

4.11 QUANTIFICAÇÃO DOS INDICADORES ENZIMÁTICOS E NÃO ENZIMÁTICOS DO ESTRESSE OXIDATIVO

Para análises dos parâmetros enzimáticos e não enzimáticos do estresse oxidativo foram coletadas amostras de aorta dos animais de grupos controle e frutose 6%. As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato 200 mM (pH 6,5, 4 °C), e centrifugadas a 8900 rpm durante 20 minutos a 4 °C. Todas as amostras foram preparadas sempre no gelo. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicatas. O sobrenadante foi coletado e colocado em tubos, os quais foram armazenados em freezer -80 °C até a determinação do nível proteico e da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione-S-transferase (GST), glutathione reduzida (GSH) cujas metodologias estão descritas a seguir.

Quantificação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada conforme metodologia descrita por Marklund (MARKLUND; MARKLUND, 1974) o qual se baseia na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogalol. Para isto, alíquotas dos sobrenadantes (20 µl) obtidos com a homogeneização da aorta em tampão de fosfato de potássio (200 mM, pH 8,5) foram adicionados a tubos contendo pirogalol (25 µl; 1 mM) e solução tampão de Tris HCl-EDTA (443 µl; 200 mM, pH 8,5), e misturados em vórtex por um minuto. Após 20 min de incubação em temperatura ambiente, a reação foi interrompida com a adição de 12,5 µl de HCl 1 N. A mistura foi centrifugada por 4 min (14.000 rpm, 4 °C) e 300 µl do sobrenadante de cada amostra foi pipetado em microplaca. A leitura da absorbância foi realizada a 440 nm. Os resultados foram comparados com a média das somas de dois controles (tampão Tris-EDTA, mais a amostra com pirogalol sem a incubação por 20 minutos), sendo valor igual a 100%. A quantidade de proteína que inibe a reação em 50% (IC 50) equivale a 1 unidade (U) de SOD. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína.

Quantificação da atividade da enzima catalase

A determinação da atividade da catalase foi mensurada com base no método descrito por Aebi (AEBI, 1984), o qual consiste na determinação da taxa constante da decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que pode ser acompanhada pelo decréscimo na absorbância em 240 nm. A diferença na absorbância (ΔA_{240}) por unidade de tempo é uma medida da atividade da catalase. Estas análises foram realizadas em triplicatas. Para isso 20 μ L da amostra homogeneizada em tampão fosfato pH 6,5 (ver item 3.13) ou água destilada (branco, sem a amostra de tecido), foram adicionadas a 980 μ L de uma solução de reação 20 mM (tampão Tris-EDTA 5 mM, pH 8.0, peróxido de hidrogênio 30% e água milli-Q). A reação é iniciada pela adição do peróxido de hidrogênio. A taxa constante foi determinada pela medida da alteração da absorbância (240 nm) por minuto. Os valores da atividade da catalase foram expressos como μ mol CAT/min/mg proteína.

Quantificação da atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx)

A atividade da glutathione peroxidase (GPx) foi determinada conforme descrito por Lawrence (LAWRENCE; BURK, 1976). A reação da GPx é feita através da medida da formação de glutathione oxidada (GSSG), a partir da glutathione reduzida (GSH). A molécula de GSSH formada nesta reação é regenerada à sua forma reduzida (GSH) através da reação paralela com a molécula de NADPH. Nesta metodologia temos dois controles, um controle é feito sem a presença da NADPH, assim não tem a formação a GSH, sem decréscimo na absorbância, deste modo os valores que temos nas reações das amostras (com NADPH) é realmente da atividade da GPx. O outro controle é feito sem a enzima glutathione redutase, que é necessária para que ocorra a reação da GPx, neste controle temos redução na absorbância. Esses controles são feitos para cada amostra. O cálculo da GPX é feito utilizando o coeficiente de extinção lembrando que coeficiente de extinção é o valor de absorbância para uma quantidade em mol de uma solução de determinada substância em um pocinho de altura de 1 cm.

Esses experimentos foram realizados em triplicatas para cada amostra testada. Em placas de 96 poços, foram pipetados 10 µl do sobrenadante da amostra obtida como descrito no item 3.13, ou água destilada (para determinação dos valores basais de absorbância; “branco”), os quais foram misturados a 130 µl de solução de reação (composta por: 3,08 mM de azida sódica, 0,31 mM de β -NADPH, 1,54 unidades/mL de glutathiona redutase de levedura, e 3,08 mM de GSH 100 mM de tampão fosfato de sódio; pH 7,0). Após 3 min de estabilização, a reação foi iniciada pela adição de 60 µl de peróxido de hidrogênio 5 mM em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0. O decréscimo de absorbância foi medido imediatamente a 340 nm por 1 min, em intervalos de 10 s. A atividade da GPx foi expressa em moles/mg de proteína/min.

Quantificação da atividade da enzima glutathiona-S-transferase (GST)

A atividade da glutathiona-S-transferase (GST) foi determinada com base no método descrito por Habig e colaboradores (HABIG *et al.*, 1974). Este método mensura a atividade específica da GST através da conjugação do 1-cloro-2,4-dinitro-benzeno (CDNB) com a glutathiona reduzida (GSH), que forma um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento de absorbância. Para caracterização da atividade da enzima GST, 100 µl do sobrenadante das amostras (preparadas como descrito no item 3.13) foram colocados em placas de 96 poços, na qual se adicionou 200 µl da solução de reação (composta por 3 mM de CDNB diluído em etanol PA e 3 mM GSH diluídos em tampão fosfato). A atividade da GST foi quantificada em intervalos de 10 s durante 1 min, em espectrofotômetro a 340 nm e expressa em µmoles/mg/min.

Quantificação dos níveis da glutathiona reduzida (GSH)

Os níveis de grupos sulfídricos não proteicos (GSH) foram determinados em amostras de aorta pelo método descrito por Sedlak e Lindsay (1998). (SEDLAK; LINDSAY, 1968). Em 50 µL do homogenato de aorta (obtido como descrito no item 3.13, sem ser centrifugado), foram adicionados 40 µL de ácido tricloroacético (ATC) 12,5%. As misturas foram agitadas por dez minutos, seguida por centrifugação por 15 min (3000

rpm, 4 °C). Uma alíquota de 10 µL do sobrenadante obtido de cada amostra foi incubada em placas de 96 poços contendo 290 µl de tampão Tris-HCL (4 M, pH 8,9) e 5 µL de DTNB (5,5'-ditiobis 2-ácidonitrobenzóico 10 mM). Uma curva padrão de GSH foi utilizada como controle de reação e para o cálculo de regressão linear e determinação dos níveis de GSH nas amostras. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata. A leitura da absorbância foi realizada a 415 nm. Os valores foram expressos em µg de GSH/g de tecido.

Determinação dos níveis de hidroperóxidos lipídicos

A determinação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) foi realizada em aorta pelo método de FOX2, conforme descrito por Jiang e colaboradores (JIANG *et al.*, 1991). O método é baseado na oxidação do íon ferroso em íon férrico pelos LOOH sob condições ácidas. Íons férricos formam um complexo com o xilenol laranja, que é um indicador desses íons, gerando um complexo azul púrpura que possui absorbância entre 550 a 600 nm. O reagente de FOX2 é composto por xilenol laranja (1 mM), H₂SO₄ 25 mM, FeSO₄.NH₄ (250 mM) e BHT (4 mM), dissolvidos em metanol 90%. Para esses experimentos a aorta foi homogeneizada em metanol PA (1:4) e centrifugada por 20 min a 9000 g (4 °C). O sobrenadante foi colocado em triplicata em placas de 96 poços, nas quais foram adicionados 240 µL do reagente de FOX2. As placas foram incubadas por 30 min em temperatura ambiente e lidas em espectrofotômetro a 560 nm. A concentração de LOOH foi obtida com base em 1 mg de proteína de amostra.

4.12 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DA VIA RHOA/ROCK

A aorta dos animais dos grupos controle e frutose 6% foram retiradas dos mesmos grupos experimentais utilizados para os estudos *in vitro* sobre a reatividade do leito vascular renal (descrito no item 4.7). Imediatamente após, as aortas foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer -80 °C até o momento do processamento. Algumas aortas dos grupos controle e frutose 6% após serem retiradas dos animais foram colocadas em cubas contendo PSS, e estimuladas por 1 h com a adição de

fenilefrina (1 μ M), após este período foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer -80 °C até o momento do processamento. As amostras, ainda congeladas foram pulverizadas e aproximadamente 100 mg de tecido foi colocado em tubos contendo 200 μ l de tampão de lise (composto por tampão Tris-HCl 50 mM contendo: 3,1 mM de sucrose; 1 Mm de dithiothreitol, DTT; 10 μ g/ml de leupeptina; 10 μ g/ml de inibidor de tripsina, *soybean*; 2 mg/ml de aprotinina e; 0,1% Triton X-100). As amostras foram sonificadas por 5 s a uma potência de 60 Watts e mantidas em gelo por 1 h. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo, ficando armazenado em freezer -80 °C até o dia dos experimentos. A medida do conteúdo total de proteínas nas amostras foi realizada pelo método de BCA, por meio de um kit comercial (Pierce Chemical, Rockford, IL, EUA). O padrão (Precision Plus Protein Standards, Kaleidoscope, BioRad) e alíquotas das amostras contendo 40 μ g de proteínas foram submetidas a eletroforese, utilizando-se um gel de separação e um de entrada ambos de poliacrilamida (dodecil sulfato-poliacrilamida) (SDS-PAGE) 7, 10 ou 12%, de acordo com o peso molecular desejado. A corrida realizada com o tampão de corrida foi realizada durante 3 h a 90 V. Em seguida as proteínas que estavam no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), durante 1 h a 100 V e temperatura de 4 °C. As membranas foram coradas com Ponceau e lavadas com TBS-T durante 30 min, sob agitação. Após este período foram bloqueadas em tampão TBS-T em leite 5%, previamente preparado em solução TBS-*tween* por 1 h. Em seguida as membranas foram incubadas com anticorpos primários contra β -actina (1:25000), Rho-A (1:200), ROCK I (1:500), e SERCA2 (1:1000), durante 14-16 h. A exposição aos anticorpos primários foi realizada *over-night* a 4 °C sob agitação constante. No dia seguinte as membranas foram lavadas em solução TBS-*tween* por 30 min sempre sob agitação. Em seguida os anticorpos secundários (1:5000, conjugados a peroxidase) foram incubados por uma hora sob agitação em temperatura ambiente. Para revelação as membranas foram expostas à ECL (Plus ou normal, Thermo Scientific, EUA) durante 1 min. A quimiluminescência foi detectada por revelador automático (Bio-Rad, modelo ChemiDocTM MP System 170-8280, Hercules, CA, EUA). As bandas foram quantificadas por densitometria utilizando o programa Image J 1.41 (NIH, USA), e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias em relação à β -actina.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média ($n= 6$ a 8 animais em cada grupo). Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados com o programa GraphPad Prism versão 6.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

Para análise dos testes paramétricos, pareados ou não pareados, os testes *t de Student*, análise de variância (ANOVA) de uma via ou de duas vias, seguidos pelo teste *post-hoc* de Bonferroni ou Dunnett's foram utilizados, quando apropriados. O nível de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Efeito das dietas NaCl 4%, Frutose 6% e NaCl 4%/Frutose 6% no consumo de ração, água, ganho de peso, diurese, perfil hematológico e peso dos órgãos

Apesar de não termos evidenciado alterações significativas no consumo alimentar de animais do grupo Frutose 6%, e de animais do grupo NaCl 4% terem aumentado a ingesta de ração da 2^a até a 5^a semana de avaliação, verificamos que ratos do grupo NaCl 4%/Frutose 6% consumiram quantidades menores de ração durante praticamente todo período de tratamento (2^a a 6^a semanas), o que foi acompanhado de menor ganho de peso (Figura 7A e 7B). Por sua vez, em diferentes semanas de avaliação, o consumo de água foi maior entre os animais que receberam ração adicionada de NaCl 4% (tanto isoladamente como associada com frutose 6%), o que foi acompanhado de aumento do volume urinário (Figura 7C e 7D, respectivamente), sem alterações no pH ou na densidade urinária (resultados não mostrado).

A análise do perfil hematológico (Tabela 1) revelou aumento no nível de plaquetas no grupo NaCl 4%/Frutose 6%, sem quaisquer outras alterações significativas nos demais parâmetros avaliados entre os grupos experimentais estudados.

Apesar de não termos encontrado diferenças nos valores de ácido úrico plasmático ou nos índices glicêmicos, verificamos que animais do grupo NaCl 4%/Frutose 6% apresentaram aumento significativo nos níveis de creatinina plasmática (Tabela 2). A

artéria aorta e o coração não tiveram diferença no peso final entre os grupos. Entretanto, o rim esquerdo dos animais NaCl 4%/Frutose 6% tanto no peso seco como no peso úmido foram diferentes significativamente quando comparados ao do grupo ração padrão, controle (Tabela 3).

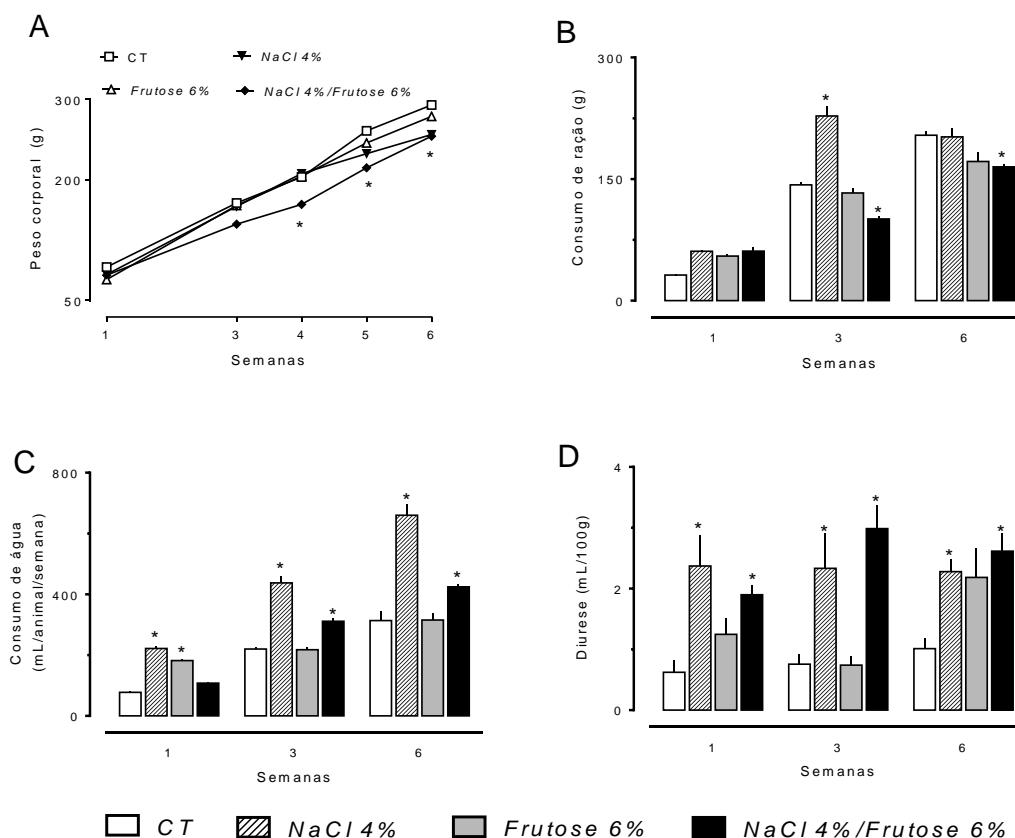


Figura 7. Consumo de ração, água, ganho de peso ponderal e diurese. Em A) no gráfico de linha os resultados mostram o aumento peso semanal em gramas e estão expressos como a média \pm erro padrão da média ($n = 5$). A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo pós- teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle (CT). Em B) os resultados mostram o consumo semanal em gramas, e estão expressos como a média \pm erro padrão da média ($n = 5$). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo pós- teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle (CT) na mesma semana de avaliação. Em C) os resultados mostram o consumo hídrico semanal em mL, e estão expressos como a média \pm erro padrão da média ($n = 5$). A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo pós- teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle (CT). E em D) os valores mostram o volume cumulativo (mL) de urina em 8 h. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média ($n = 5$). A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo pós- teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Tabela 1. Efeito da dieta acrescida de NaCl 4%, Frutose 6% e NaCl 4%/Frutose 6% nos parâmetros bioquímicos

Parâmetros	Grupos			
	CT	NaCl 4%	Frutose 6%	NaCl 4%/Frutose 6%
<i>Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)</i>	9,9 ± 1,44	9,5 ± 0,85	9,2 ± 1,2	6,9 ± 0,77
<i>Hemoglobina ($10^3/\mu\text{L}$)</i>	12,2 ± 0,35	12,9 ± 0,28	12,1 ± 0,45	11,7 ± 0,31
<i>Hematócrito (%)</i>	46,6 ± 2,39	46,1 ± 0,85	45,4 ± 2,19	41,8 ± 1,02
<i>Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)</i>	1062 ± 67,6	1197 ± 10,0	1017 ± 91,6	1282 ± 58,7 ^a
<i>Linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$)</i>	7,54 ± 1,39	6,98 ± 0,66	7,36 ± 1,02	5,14 ± 0,57
<i>Monócitos ($10^3/\mu\text{L}$)</i>	1,02 ± 0,12	1,18 ± 0,13	0,92 ± 0,13	0,86 ± 0,11
<i>Granulócitos ($10^3/\mu\text{L}$)</i>	1,00 ± 0,13	1,36 ± 0,19	0,94 ± 0,15	0,92 ± 0,17

Os resultados estão expressos como a média ± erro padrão da média (n = 5) e referem-se aos valores mensurados em amostras coletadas dos animais após 6 semanas de exposição às dietas. A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós- teste de Bonferroni. ^ap < 0,05, quando comparado ao grupo controle (CT).

Tabela 2. Efeito da ração contendo quantidades aumentadas de NaCl 4%, Frutose 6% e NaCl 4%/Frutose 6% nos níveis plasmáticos de ácido úrico, creatinina e glicose.

Parâmetros	Grupos			
	CT	NaCl 4%	Frutose 6%	NaCl 4%/Frutose 6%
<i>Ácido úrico (mg/dL)</i>	2,70 ± 0,25 (5)	2,83 ± 0,17 (5)	2,71 ± 0,26 (5)	3,17 ± 0,35 (5)
<i>Creatinina (mg/dL)</i>	0,88 ± 0,07 (4)	0,90 ± 0,09 (6)	1,11 ± 0,24 (5)	1,49 ± 0,10 ^a (6)
<i>Glicose (mg/dL)</i>	127,2 ± 3,94 (5)	121,3 ± 2,72 (4)	124,3 ± 2,35 (4)	131,2 ± 2,39 (5)
<i>Glicose/jejum (mg/dL)</i>	100,7 ± 0,66 (4)	114,7 ± 3,52 (4)	98,50 ± 5,90 (5)	113,8 ± 2,136 (5)

Os resultados estão expressos como a média ± erro padrão da média, e referem-se aos valores mensurados em amostras coletadas dos animais após 6 semanas de exposição às dietas. A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós- teste de Dunnett's. ^a $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle (CT).

Tabela 3. Efeito do consumo de ração acrescida de NaCl 4%, Frutose 6% e NaCl 4%/Frutose 6% no peso relativo da aorta, rim esquerdo e coração.

Tecidos	Grupos			
	CT	NaCl 4%	Frutose 6%	NaCl 4%/Frutose 6%
<i>Aorta (g)</i>	0,029 ± 0,004	0,025 ± 0,004	0,028 ± 0,003	0,023 ± 0,002
<i>Rim (g)</i>	0,490 ± 0,014	0,593 ± 0,022 ^a	0,497 ± 0,015	0,631 ± 0,038 ^b
<i>Rim desidratado (g)</i>	0,087 ± 0,002	0,102 ± 0,004 ^a	0,090 ± 0,002	0,109 ± 0,003 ^c
<i>Coração (g)</i>	0,422 ± 0,013	0,448 ± 0,017	0,434 ± 0,023	0,449 ± 0,015

Os valores mostram o peso dos órgãos (em g) coletados na sexta semana e corrigidos para cada 100 g de peso dos animais. Os resultados estão expressos como a média ± erro padrão da média (n = 8-10). A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de Dunnett's. ^a $p < 0,05$, ^b $p < 0,01$ e ^c $p < 0,001$, quando comparados com o grupo controle.

5.2 Alterações macroscópicas no rim de ratos NaCl 4% e NaCl 4%/Frutose 6%

Durante os procedimentos cirúrgicos observamos que o rim dos animais expostos a dieta NaCl 4% e NaCl 4%/Frutose 6% apresentavam aumento no volume, como mostrado na Figura 8A, que traz uma foto dos rins direito e esquerdo dos diferentes grupos experimentais, obtidos poucos minutos após a retirada dos animais. As Figuras 8B e 8C destacam os rins dos grupos NaCl 4%/Frutose 6% e controle.

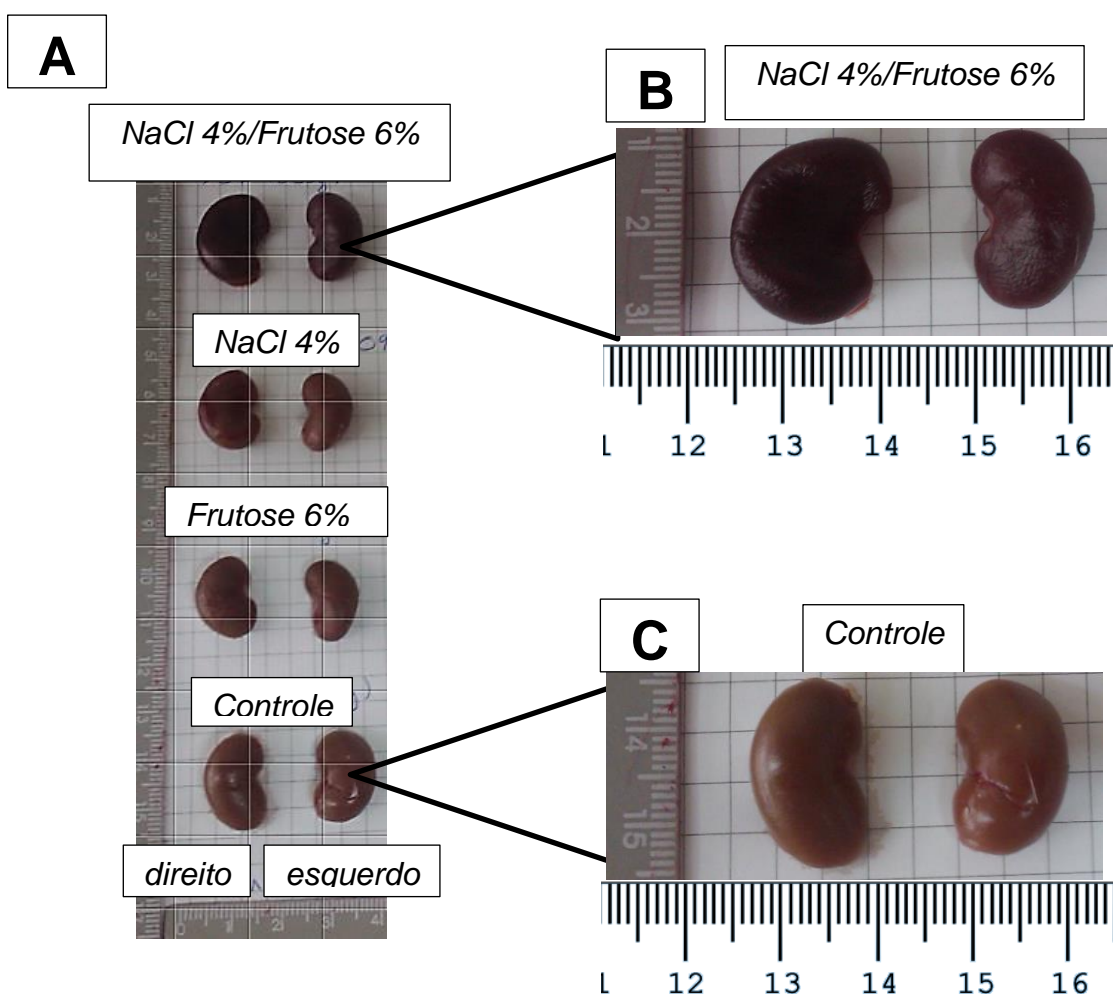


Figura 8. Registro fotográfico dos rins direito e esquerdo obtidos de ratos expostos a dieta modificada contendo NaCl 4%, Frutose 6% e NaCl 4%/Frutose 6%, na sexta semana de tratamento. A) foto dos rins direito e esquerdo dos animais de todos os grupos tratados por seis semanas. B) e C) destaque dos rins de ratos que consumiram a ração acrescida de NaCl 4%/Frutose 6% e ração padrão (grupo controle), respectivamente.

Consistente com o aumento no volume, verificamos que o peso úmido ou seco dos rins, tanto do grupo NaCl 4% como do grupo NaCl 4%/Frutose 6%, foi maior que o peso do rim dos ratos do grupo controle (Figuras 9A e 9B e tabela 3).

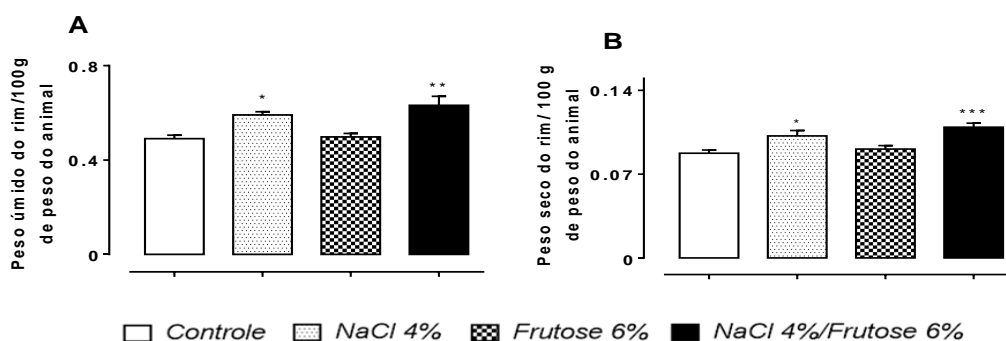


Figura 9. Efeito do consumo por seis semanas da dieta modificada com NaCl 4% e Frutose 6% no peso seco e úmido do rim. Peso úmido (A) e peso seco (B) de rim de animais dos grupos controle, NaCl 4%, Frutose 6% e NaCl 4%/Frutose 6%. Resultados expressos como a média \pm o erro padrão da média ($n = 6-8$). A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste Dunnett. * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle.

5.3 Efeito do consumo de ração acrescida de sódio e/ou frutose na pressão arterial média e reatividade vascular em ratos anestesiados

A pressão arterial média (PAM) registrada pelo método direto (sob anestesia) foi aproximadamente 25% mais elevada no grupo NaCl 4%/Frutose 6%, se comparada à PAM registrada em ratos expostos à dieta padrão ($126,3 \pm 5,87$ e $100,0 \pm 5,20$ mm Hg, nos grupos NaCl 4%/Frutose 6% e CT, respectivamente; Figura 10). Nesses mesmos animais avaliamos a resposta sistêmica à administração intravenosa de drogas vasoativas. A administração intravenosa de fenilefrina gerou uma resposta hipertensora de menor intensidade no grupo Frutose 6%, se comparado ao grupo CT. Por exemplo, a dose de 20 nmol/kg de fenilefrina elevou a PAM dos grupos CT e Frutose 6% em $46,75 \pm 10,10$ e $28,52 \pm 2,51$ mmHg, respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 11A). A vasopressina administrada na dose de 20 pmol/kg também gerou uma resposta hipertensora de menor intensidade no grupo

exposto à dieta Frutose 6% ($29,9 \pm 1,69$ mm Hg), porém apenas se comparado ao grupo NaCl 4%/Frutose 6% ($54,22 \pm 2,60$ mm Hg), (Figura 11B).

A administração intravenosa da angiotensina I (Figura 11C) promoveu efeito hipertensor dependente da dose, que não foi diferente entre os grupos. Entretanto, o efeito hipertensor da angiotensina II nas doses de 20 e 60 pmol/Kg foi mais intenso ($54,92 \pm 3,48$ e $65,24 \pm 4,67$ mm Hg, respectivamente) nos animais do grupo NaCl 4%/Frutose 6%, comparado ao controle ($39,27 \pm 4,68$ e $46,61 \pm 4,68$, respectivamente) (Figura 11D). Apesar das diferenças encontradas nos picos das respostas a alguns agentes vasoativos, não existiram alterações significativas no tempo de duração do efeito dos vasopressores testados em nosso estudo em nenhum dos grupos experimentais (resultados não mostrados).

Ao avaliarmos o efeito de agentes vasodilatadores, nossos resultados mostraram que a administração intravenosa de acetilcolina promoveu efeito hipotensor semelhante em todos os grupos experimentais (Figuras 12A). Por outro lado a administração intravenosa de bradicinina, na dose de 60 nmol/kg, teve um efeito hipotensor acentuado no grupo NaCl 4%/Frutose 6% ($-51,23 \pm 5,17$ mm Hg) comparado ao grupo tratado com ração padrão ($-35,21 \pm 5,58$ mm Hg) (Figura 12B). Apesar destes resultados a duração do efeito hipotensor induzido pela administração da acetilcolina ou pela bradicinina não foi diferente entre os grupos (Figuras 12C e 12D).

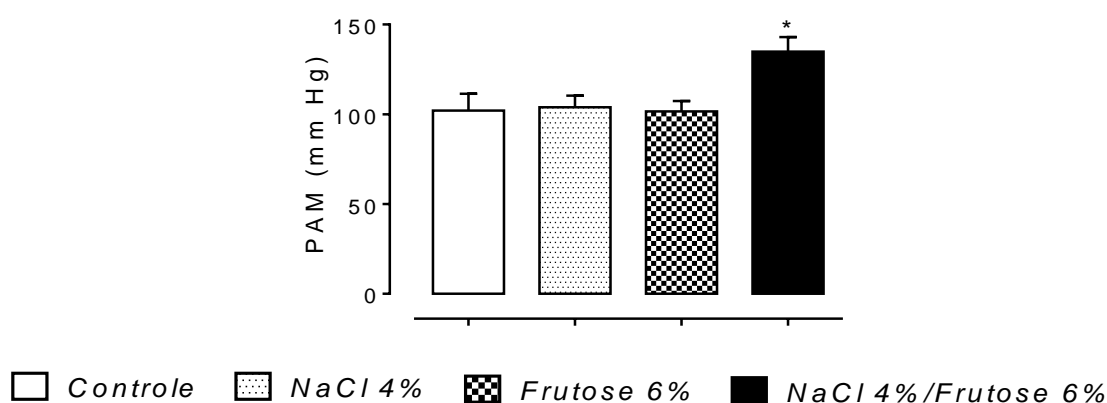


Figura 10. Aumento na pressão arterial média basal de ratos expostos à dieta acrescida de NaCl 4%/Frutose 6%. A pressão arterial média (PAM) foi registrada (mm Hg) em animais anestesiados. Resultados estão expressos como a média \pm o erro padrão da média ($n = 6-8$). A análise estatística foi realizada utilizando-se a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni. $*p < 0,05$, comparado ao grupo controle.

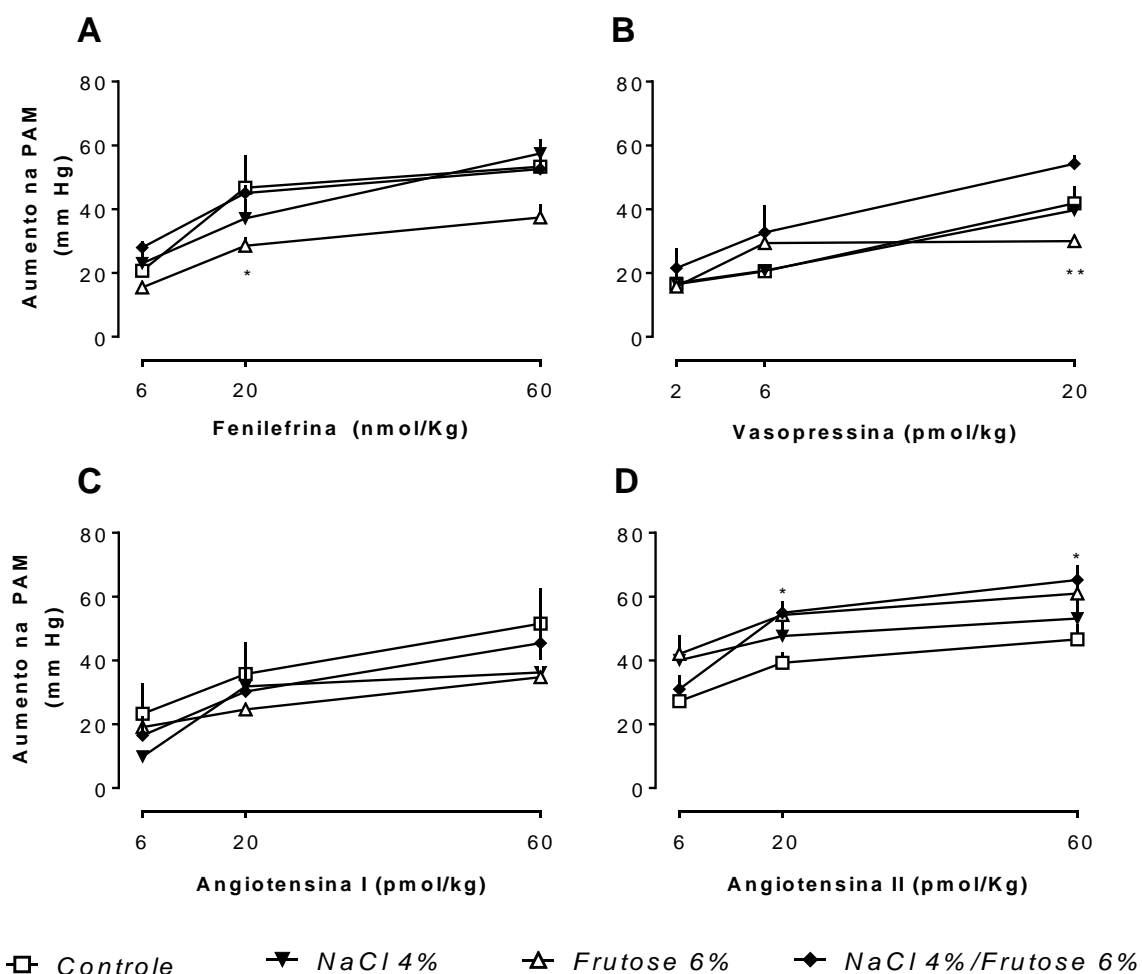


Figura 11. Influência da dieta sobre o efeito hipertensivo da fenilefrina, vasopressina, angiotensina I e angiotensina II. Alterações produzidas na PAM (mm Hg) de ratos expostos a dieta padrão (controle), NaCl 4%, Frutose 6% e NaCl 4%/Frutose 6%. Em A) observamos efeito hipertensivo do tratamento com fenilefrina; em B) efeito hipertensivo da vasopressina e em C) e D) efeito hipertensivo da administração da angiotensina I e angiotensina II, respectivamente. Resultados estão expressos como a média \pm o erro padrão da média ($n = 6-8$). A análise estatística entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo pós-teste de Dunnett's. * $p < 0,05$ em A e D em relação ao grupo controle, e ** $p < 0,01$ em B comprado ao grupo NaCl 4%/Frutose 6%.

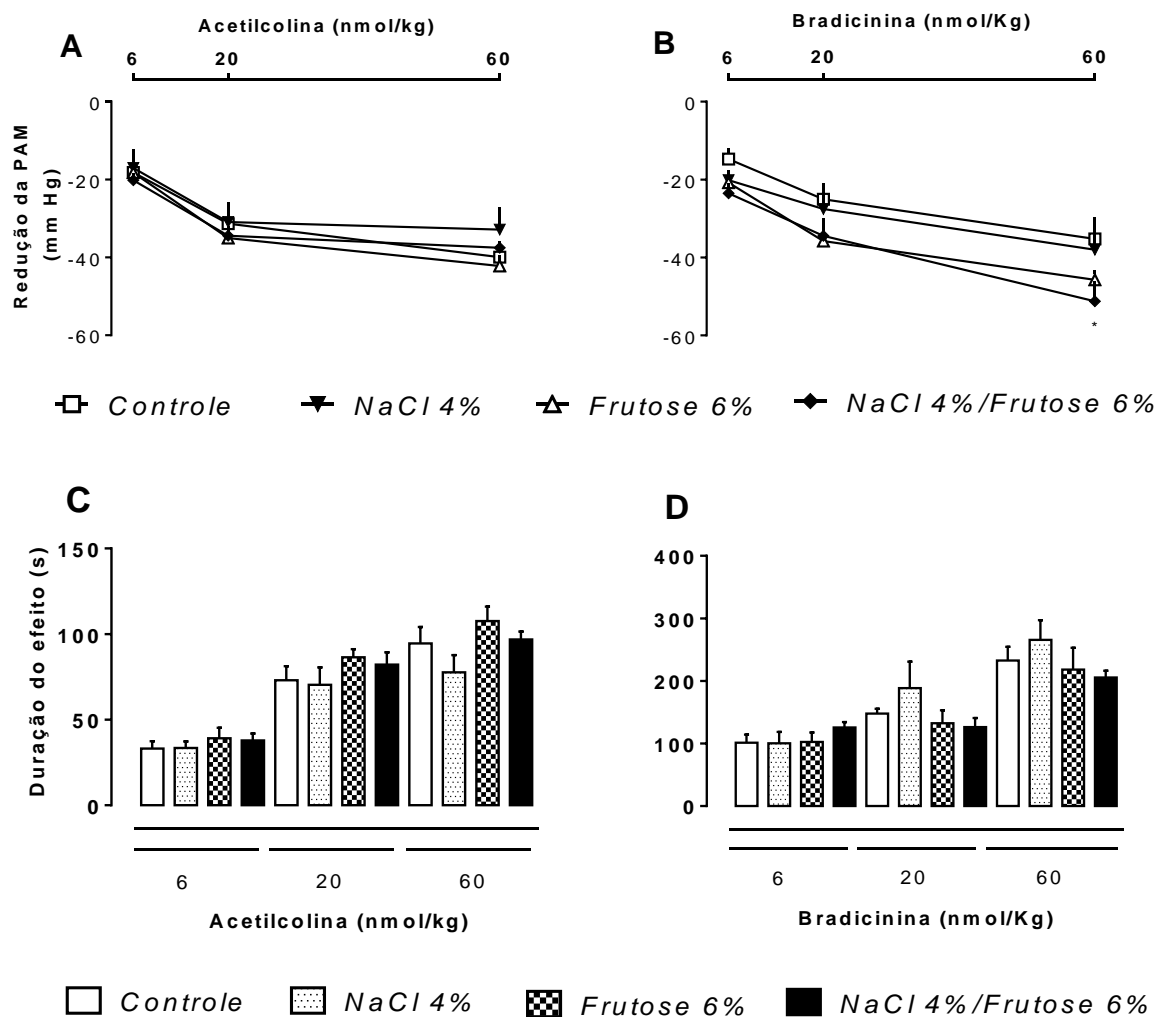


Figura 12. Influência da dieta sobre o efeito hipotensor da acetilcolina e bradicinina em ratos anestesiados. Efeito de agentes hipotensores em ratos controle, NaCl 4%, Frutose 6% e NaCl 4%/Frutose 6%. Em A, efeito hipotensor da administração da acetilcolina; em C, tempo de duração do efeito da acetilcolina (s); em B, efeito hipotensor da bradicinina e em D) duração do efeito da bradicinina. Os resultados estão expressos como a média \pm o erro padrão da média ($n = 6-8$). A análise estatística entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle.

5.4 Efeito da dieta na pressão arterial sistêmica e na frequência cardíaca de ratos sem o efeito de anestésico

Ratos expostos a dieta e Frutose 6% e NaCl 4%/Frutose 6% (Figura 13B e 13C respectivamente) apresentaram níveis basais elevados da pressão arterial sistêmica na sexta semana de tratamento quando comparada a pressão arterial dos ratos dieta padrão (controle). Além disso, os ratos dos grupos Frutose 6% e NaCl 4%/Frutose 6% (Figuras 13E e 13F, respectivamente) apresentaram aumento na frequência cardíaca, sendo que os animais do grupo NaCl 4%/frutose 6%, desde a quarta semana (Figura 13F).

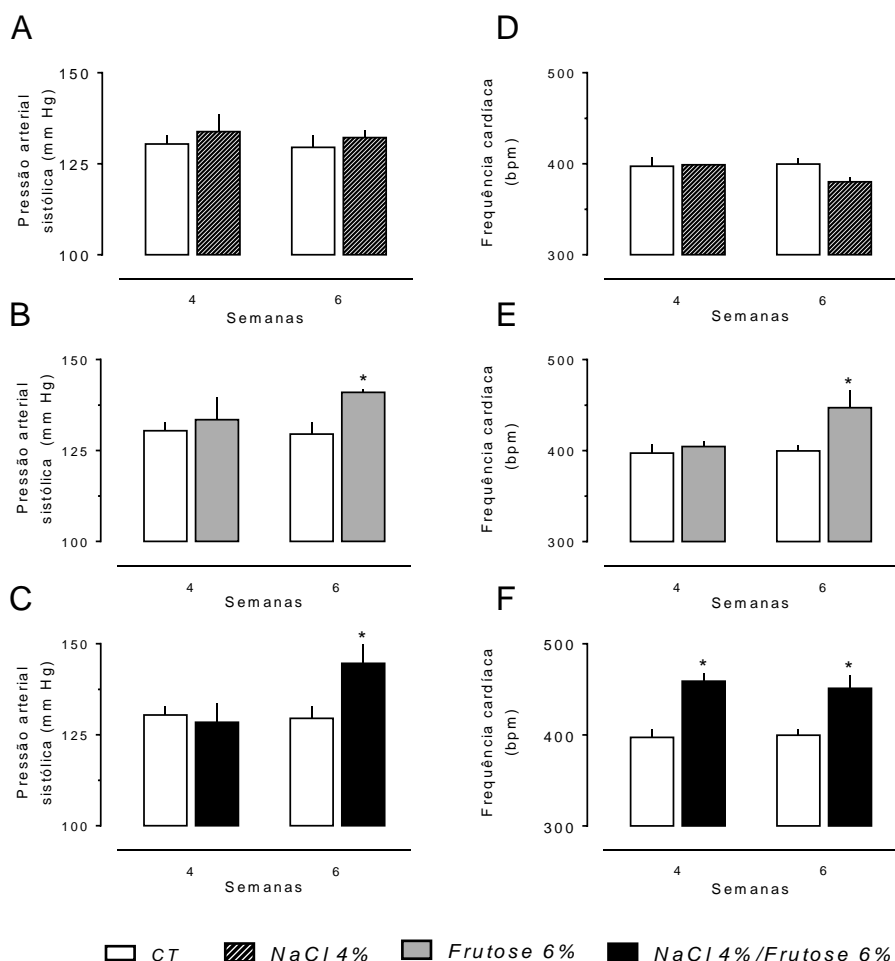


Figura 13. Pressão arterial sistólica de ratos acordados na quarta e na sexta semana de tratamento. Em A e D) pressão arterial e frequência cardíaca em ratos NaCl 4%, em B e E) pressão arterial e frequência cardíaca em ratos do grupo exposto à dieta Frutose 6%, e em C e F) pressão arterial e frequência cardíaca de ratos NaCl 4%/Frutose 6%. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média ($n = 6-8$). A análise estatística foi verificada pelo teste t de Student. * $p < 0,05$, quando comparado ao controle na mesma semana de tratamento.

5.5 Avaliação da pressão de perfusão vascular renal (PPVR) em ratos expostos a dieta acrescida de NaCl 4%, Frutose 6% e NaCl 4 %/ Frutose 6%

A Figura 14A mostra que a PPVR basal do grupo NaCl 4%/Frutose 6% foi aproximadamente 30% superior àquela registrada no grupo controle ($72,92 \pm 3,51$ e $55,91 \pm 3,75$ mm Hg, respectivamente).

As preparações renais do grupo NaCl 4%/Frutose 6%, quando expostas à fenilefrina (dose única de 30 nmol), apresentaram uma reatividade mais intensa, aumentando a PPVR neste grupo em ~70 mm Hg, enquanto que no grupo controle o aumento na PPVR foi de ~55 mm Hg (Figura 14B). Do mesmo modo, observamos uma hiper-reatividade no leito vascular renal no grupo NaCl 4%/Frutose 6% quando as preparações foram expostas a doses crescentes de fenilefrina (10 a 300 nmol), adicionadas de forma não cumulativas (Figura 14C). A administração da vasopressina (0,1-300 pmol) revelou um aumento na resposta vasopressora somente na dose de 3 pmol para o grupo NaCl 4%/Frutose 6% (Figura 14D).

5.6 Reatividade do leito vascular mesentérico (LVM) de ratos expostos a dieta contendo NaCl 4% e /ou frutose 6%

O leito vascular mesentérico obtido de animais expostos à dieta com adição de NaCl 4%, Frutose 6% e NaCl 4%/Frutose 6% não apresentaram variações na pressão de perfusão basal (Figura 15A). Entretanto, quando as preparações foram expostas a concentrações crescentes não cumulativas de fenilefrina, o aumento gerado na pressão de perfusão no LVM de ratos frutose 6% e NaCl 4%/Frutose 6% foi aproximadamente 60% menor do que a pressão registrada no grupo que recebeu ração controle (Figura 15B). O mesmo perfil de resposta foi observado quando as preparações foram expostas à vasopressina, a pressão de perfusão do LVM nos grupos Frutose 6% e NaCl 4%/Frutose 6% foi reduzida em aproximadamente 37 e 62% nas doses de 30 e 100 pmol, respectivamente (Figura 15C).

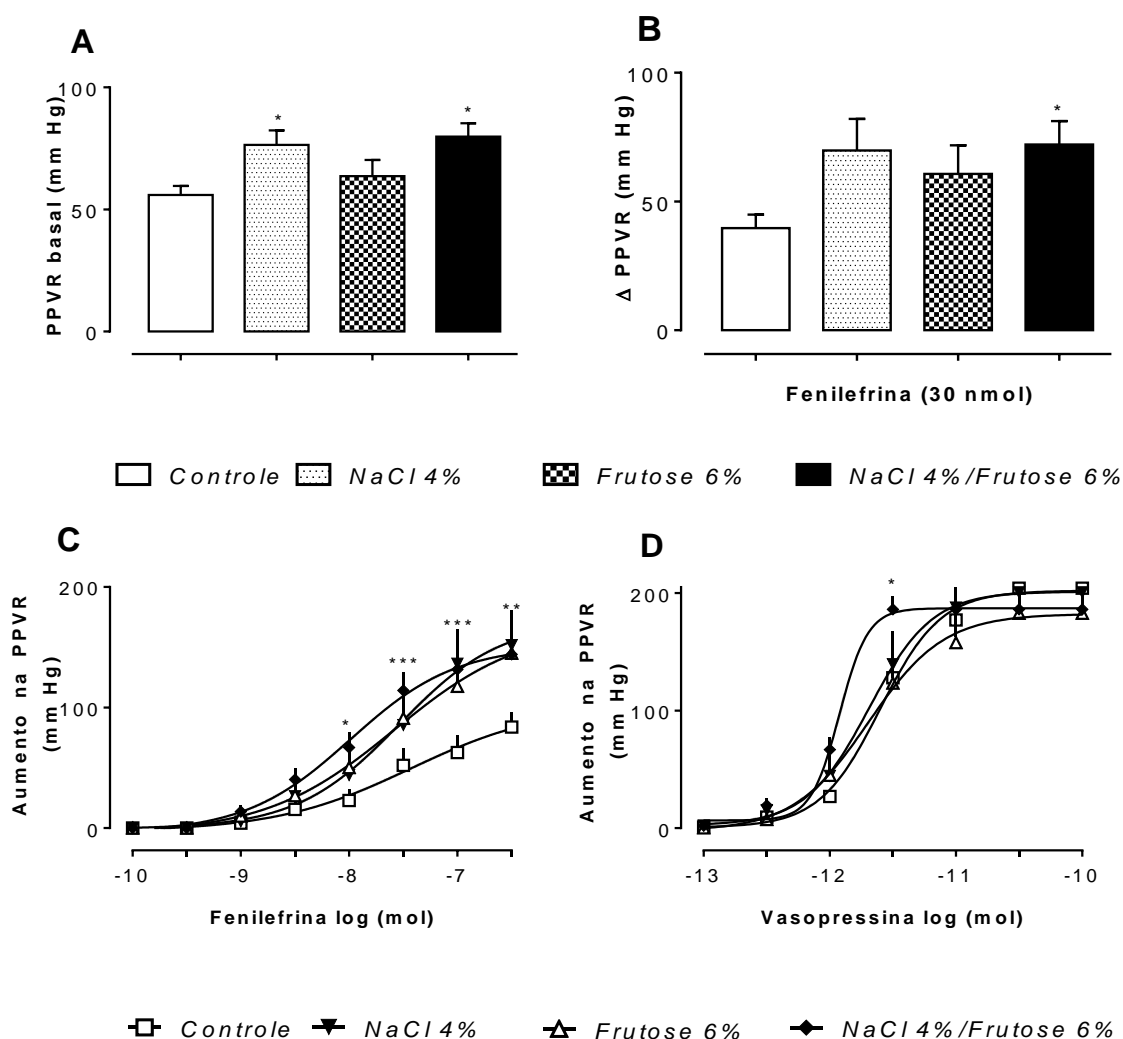


Figura. 14 Alterações na reatividade vascular renal em resposta à fenilefrina e a vasopressina em preparações renais obtidas de animais dos grupos NaCl 4%, Frutose 6% e NaCl 4%/Frutose 6% e seus controles. Em A, a pressão de perfusão vascular renal (PPVR) basal; em B, efeito agudo da administração da fenilefrina; em C, efeito da administração de doses crescentes de fenilefrina e em D, efeito da adição de vasopressina. Resultados expressos como a média \pm o erro padrão da média ($n = 6-8$). As análises estatísticas entre os grupos foram verificadas pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste Dunnett's, $*p < 0,05$ em A e B, comparado ao controle. E análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo pós-teste Dunnett's, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ em C e D quando comparado ao controle.

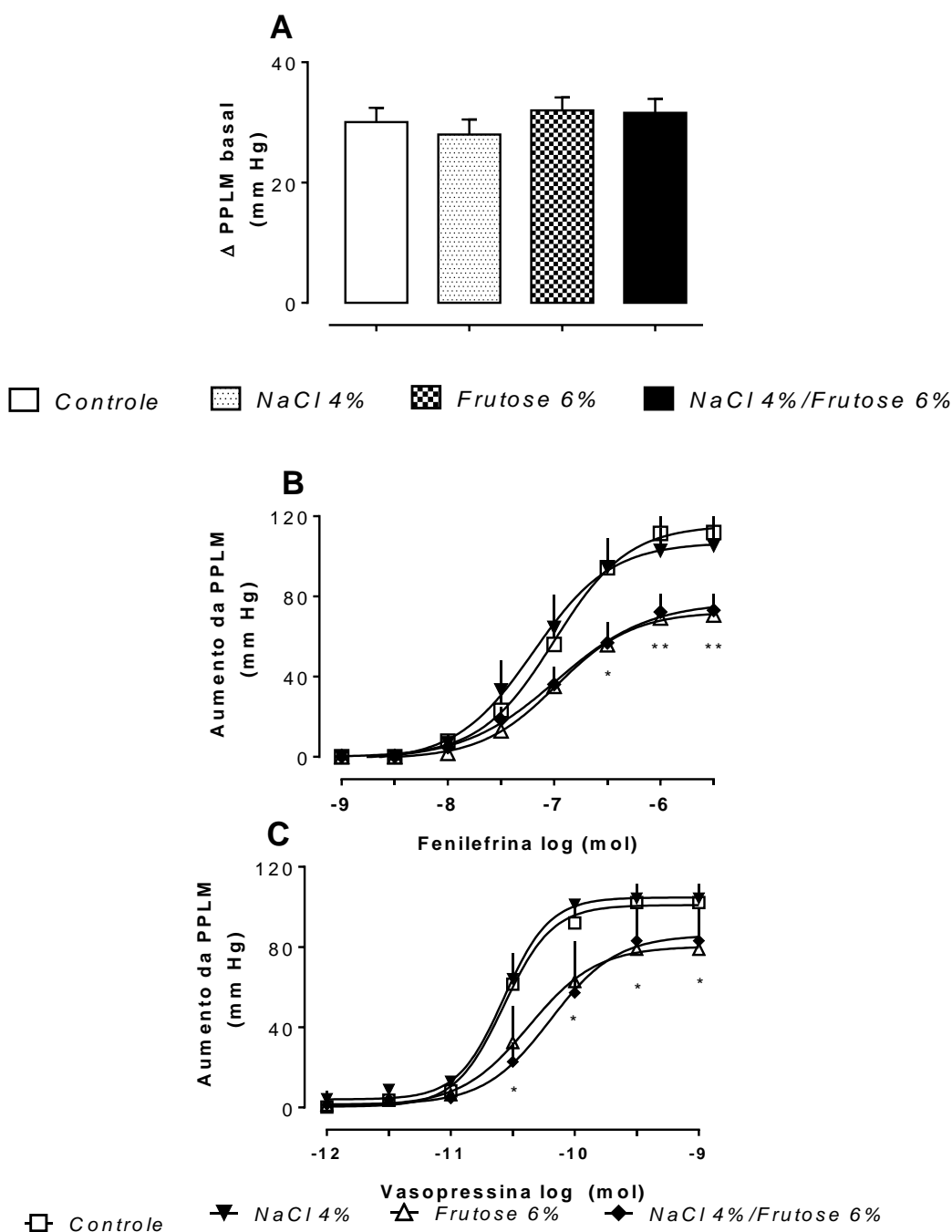


Figura 15. Redução na reatividade do leito vascular mesentérico dos grupos Frutose 6% e NaCl 4%/Frutose 6% para fenilefrina e vasopressina. Efeito da fenilefrina e vasopressina em preparações de leito vascular mesentérico obtidas de ratos expostos a dieta com NaCl 4%, Frutose 6% e NaCl 4%/Frutose 6%. Em A, pressão de perfusão basal do leito mesentérico (PPLM) em B, efeito da adição crescente não cumulativa de fenilefrina; e em C, efeito da adição crescente não cumulativa de vasopressina. Os resultados estão expressos como a média \pm o erro padrão da média ($n = 6-8$). A análise estatística entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ quando comparado ao controle.

5.7 Estudo da reatividade vascular em preparações de aorta isolada de rato

5.7.1 Relaxamento vascular dependente de endotélio induzido pela acetilcolina e independente de endotélio induzido pelo nitroprussiato de sódio

No efeito vasorrelaxante induzido pela acetilcolina, a CE_{50} calculada a partir dos dados obtidos na curva concentração resposta mostrou-se deslocada de 2,99 (2,10 - 4,28 μ M) para 1,49 (1,03 – 2,00 μ M) nos grupos controle e Frutose 6%, respectivamente (Figura 16A), sem, entretanto, qualquer alteração na resposta máxima. Por outro lado o vasorrelaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio mostrou-se mais potente em aorta de ratos expostos à dieta frutose 6% em preparações com endotélio funcional a remoção do endotélio tornou as respostas semelhantes (Figuras 16B e 16C).

5.7.2 Reatividade vascular induzida por vasoconstritores em aorta de rato com ou sem endotélio

Nas preparações de aorta isoladas de ratos do grupo Frutose 6%, com endotélio funcional, a contração máxima induzida pela adição cumulativa de concentrações crescentes de fenilefrina foi significativamente menor (E_{max} : $0,98 \pm 0,07$) do que aquela obtida em preparações do grupo controle (E_{max} : $1,73 \pm 0,08$ g), (Figura 17A). Entretanto, essa diferença não existiu quando as preparações tiveram o endotélio vascular removido antes da exposição à fenilefrina (Figura 17B).

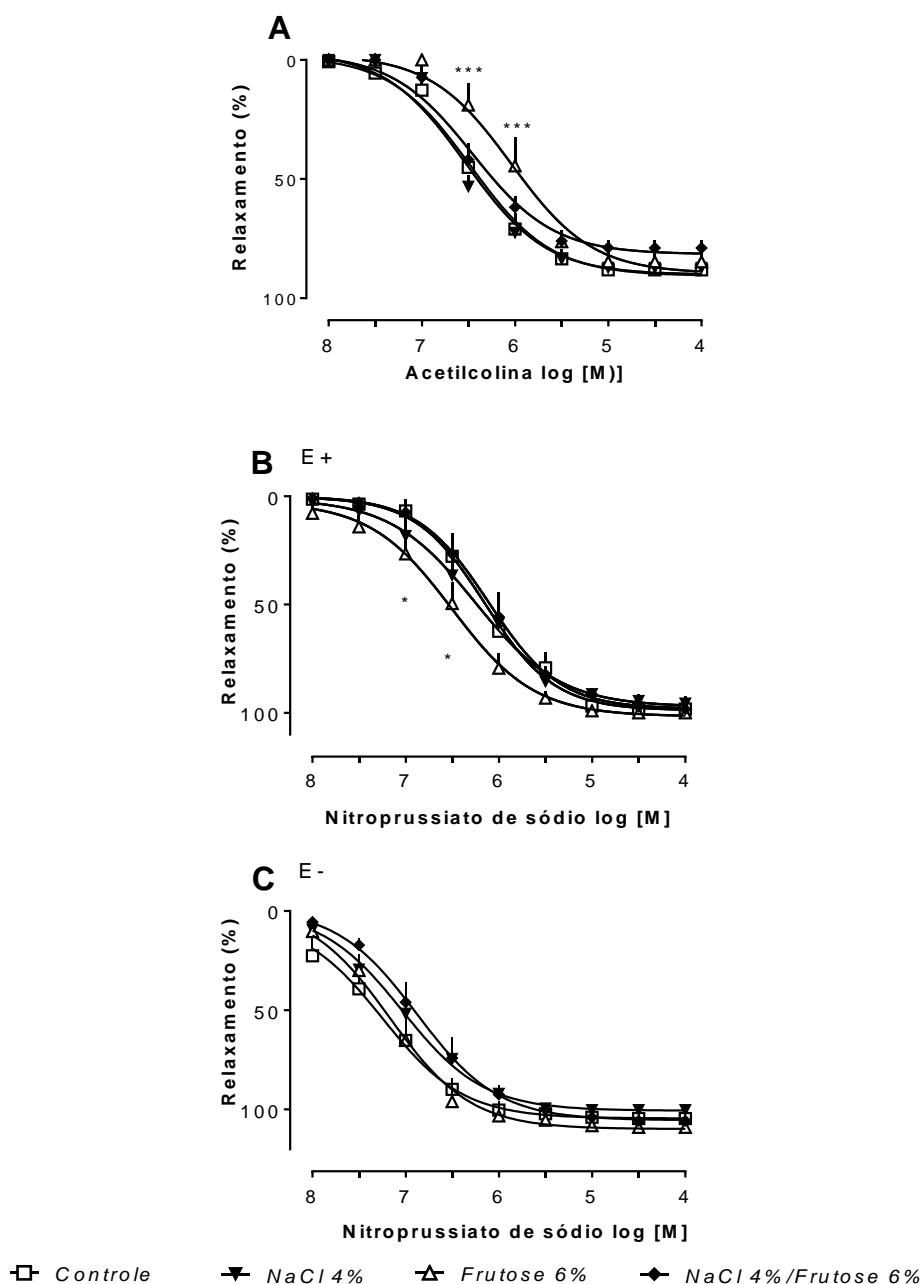


Figura 16. Relaxamento induzido pela administração cumulativa de acetilcolina ou nitroprussiato de sódio em anéis de aorta. Relaxamento obtido por vasodilatadores em aorta de ratos controle, NaCl 4%, Frutose 6% e NaCl4%/Frutose 6%. Em A, relaxamento vascular induzido pela acetilcolina; em B e C, resposta dos anéis de aorta ao nitroprussiato de sódio, na presença e ausência de endotélio funcional, respectivamente. Resultados expressos como a média \pm o erro padrão da média ($n = 6-8$). A análise estatística entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. $*p < 0,05$ e $***p < 0,001$, comparado ao grupo controle.

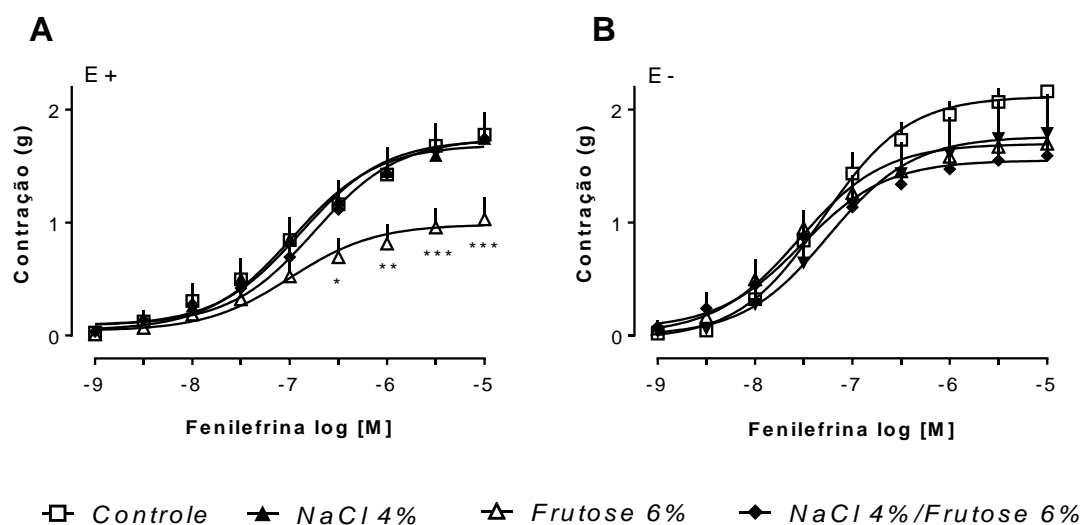


Figura 17. Redução da reatividade vascular à fenilefrina em anéis de aorta obtidos de animais expostos à dieta contendo frutose 6%. Os anéis de aorta foram obtidos de ratos expostos a dietas padrão (controle), ou contendo sódio (NaCl 4%), frutose 6% (Frutose 6%), ou ambos sódio e frutose (NaCl 4%/Frutose 6%). Em A, resposta contrátil para fenilefrina em preparações com endotélio vascular; e em B, contração induzida pela fenilefrina em anéis de aorta sem o endotélio funcional. Resultados expressos como a média \pm o erro padrão da média ($n = 6$ preparações de diferentes animais por grupo). A análise estatística entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle.

Uma vez que encontramos alterações vasculares significativas na reatividade vascular de anéis aórticos obtidos do grupo Frutose 6%, buscamos investigar as vias intracelulares potencialmente envolvidas nesses efeitos. Por isso, a maior parte dos resultados descritos a seguir foi obtida de experimentos realizados apenas com vasos de animais dos grupos Frutose 6% e do Controle.

A Figura 18 mostra que a resposta contrátil induzida pela adição de concentrações crescentes e cumulativas de AI (Figuras 18A) ou AII (Figuras 18C) em preparações de aorta com endotélio funcional foi reduzida em $\sim 52\%$ no grupo Frutose 6%, quando comparadas ao grupo controle. A remoção do endotélio impediu o aparecimento da hiporreatividade (Figuras 18B e 18D). As respostas das preparações para vasopressina não foram diferentes entre os grupos, tanto em preparações com e sem endotélio funcional (Figura 18E e 18F, respectivamente).

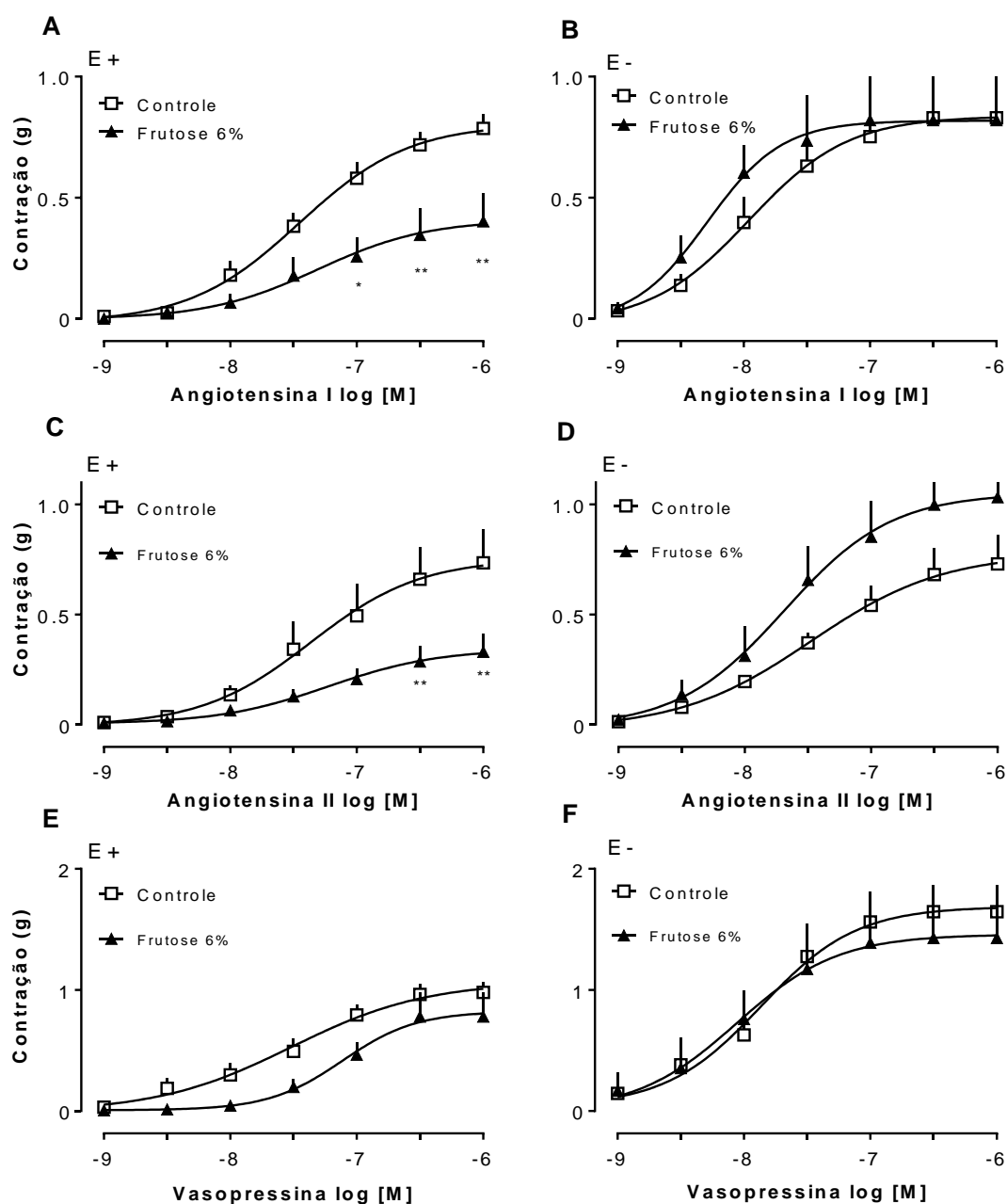


Figura 18. Hipo-reatividade vascular dos anéis de aorta com endotélio funcional para angiotensina I ou angiotensina II grupo Frutose 6%. Resposta contrátil de anéis de aorta obtidos dos animais expostos à dieta Frutose 6% e seus controles. Em A e B, reatividade para Angiotensina I, na presença e ausência de endotélio, respectivamente; em C e D, reatividade para angiotensina II, com e sem endotélio, respectivamente e E e F, resposta contrátil para vasopressina, com e sem endotélio funcional, respectivamente. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média ($n = 4-8$). A análise estatística entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Investigamos se a hipo-reatividade encontrada em anéis de aorta também ocorreria em artéria carótida isolada de ratos do grupo exposto à dieta frutose 6%.

5.7.3 Reatividade vascular induzida por vasoconstritores em artéria carótida com endotélio funcional

Nas preparações de carótidas isoladas de ratos do grupo exposto à dieta frutose 6%, com endotélio funcional, a contração máxima induzida pela adição cumulativa de concentrações crescentes de fenilefrina (Figura 19A) foi significativamente menor que do grupo controle (E_{\max} : $0,232 \pm 0,03$ g; E_{\max} : $0,395 \pm 0,02$ g, respectivamente). O mesmo foi observado com a adição cumulativa de angiotensina II (E_{\max} : $0,238 \pm 0,01$; E_{\max} : $0,341 \pm 0,01$, para frutose 6% e controle, respectivamente) (Figura 19B).

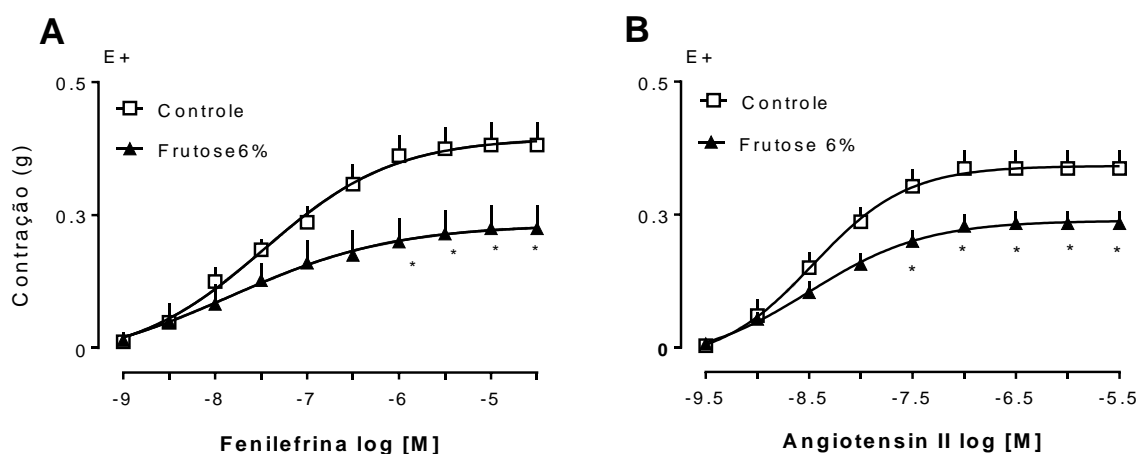


Figura 19. Hipo-reatividade vascular em artéria carótida para adição cumulativa de fenilefrina ou angiotensina II. Os anéis de carótida foram obtidos de animais dos grupos controle e grupo frutose 6%. Em A) reatividade para fenilefrina na presença de endotélio vascular. Em B) reatividade vascular para angiotensina II. Resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média ($n = 4$). A análise estatística entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. $*p < 0,05$.

5.7.4 Participação da via NO/GCs na hiporreatividade vascular induzida pela fenilefrina em aorta de ratos do grupo controle e Frutose 6%

Para avaliar como o produto da enzima NOS poderia contribuir para a hiporreatividade à fenilefrina em aortas com endotélio as preparações foram incubadas com o L-NAME. A presença do L-NAME, um inibidor não seletivo das NO sintases foi capaz de aumentar a resposta máxima induzida pela fenilefrina no grupo Frutose 6% (veículo $E_{max} = 0,85 \pm 0,72$ g; L-NAME $E_{max} = 1,94 \pm 0,15$ g) (Figura 20B), como também aumentou a resposta contrátil no grupo controle (Figura 20A), efeito semelhante à remoção do endotélio (Figura 17B).

Resultado semelhante foi obtido com o ODQ, um inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel, que também foi capaz de aumentar a resposta máxima induzida pela fenilefrina tanto em anéis de aorta do grupo controle como do grupo Frutose 6% (Figuras 20C e 20D, respectivamente).

Por outro lado a adição do carboxi-PTIO, um sequestrador de NO, não modificou a resposta no grupo controle, mas o efeito contrátil induzido pela adição da fenilefrina a CE_{50} calculada a partir dos dados obtidos na curva dose resposta mostrou-se deslocado de $5,87 \times 10^{-8}$ ($3,51 \times 10^{-8} - 8,89 \times 10^{-8}$) para $1,10 \times 10^{-8}$ ($3,28 \times 10^{-9} - 3,71 \times 10^{-8}$) no grupo Frutose 6% e Frutose 6% + C PTIO, respectivamente (Figura 21A e 21B, respectivamente). Por sua vez a incubação de 1400W, um inibidor seletivo para NOS induzida, não modificou a resposta da aorta de ratos dos grupo Frutose 6% ou controle para a fenilefrina (Figura 21C e 21D).

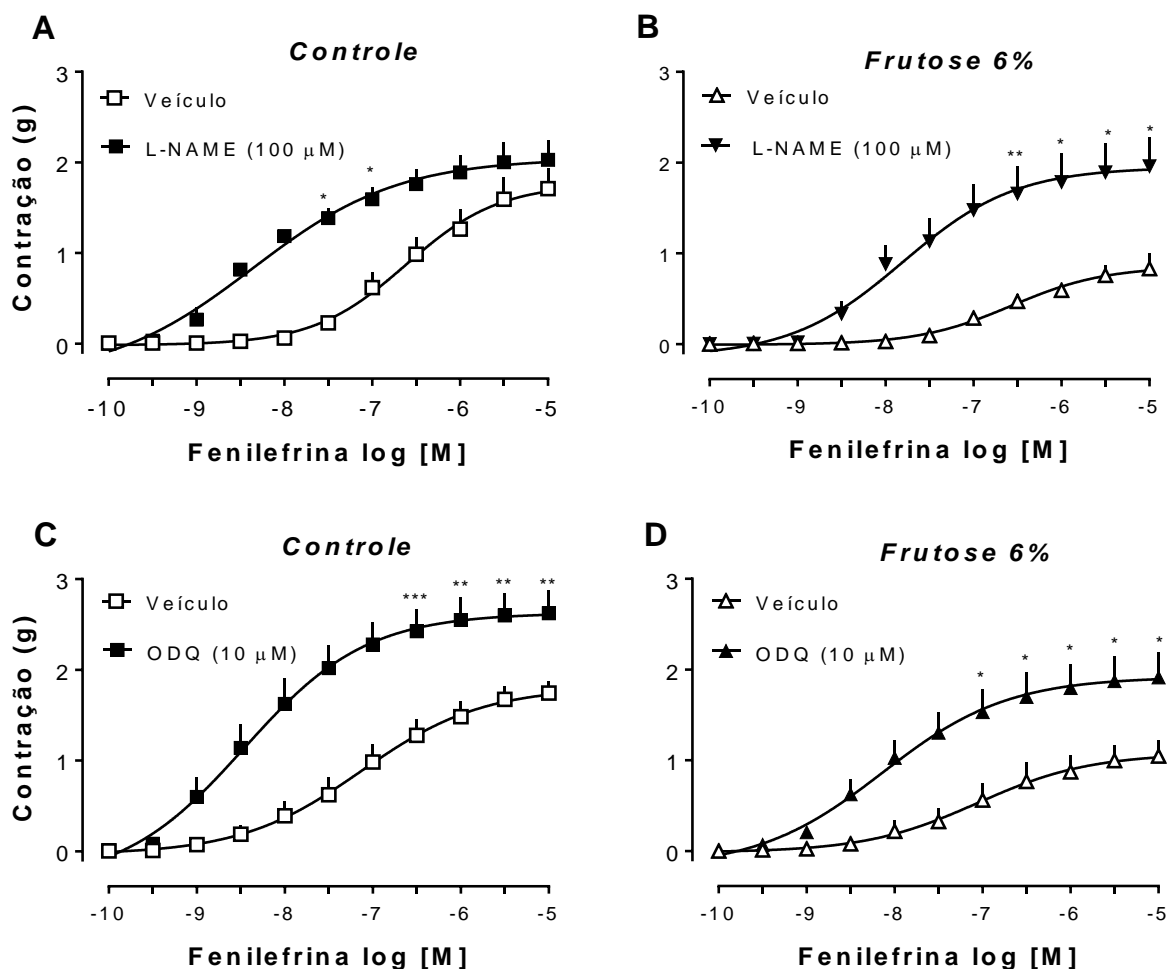


Figura 20. Aumento da reatividade vascular induzida pela fenilefrina em anéis de aorta na presença do L-NAME ou do ODQ. Contração induzida pela fenilefrina em anéis de aorta obtidos de ratos do grupo controle e Frutose 6%. Em A e B, contração induzida pela fenilefrina na presença do L-NAME em anéis de aorta do grupo controle e Frutose 6%, respectivamente; em B e C, resposta contrátil induzida pela fenilefrina na presença do ODQ em aorta do grupo controle e frutose respectivamente. Resultados expressos como a média \pm o erro padrão da média ($n = 6-8$). A análise estatística entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, quando comparado ao veículo.

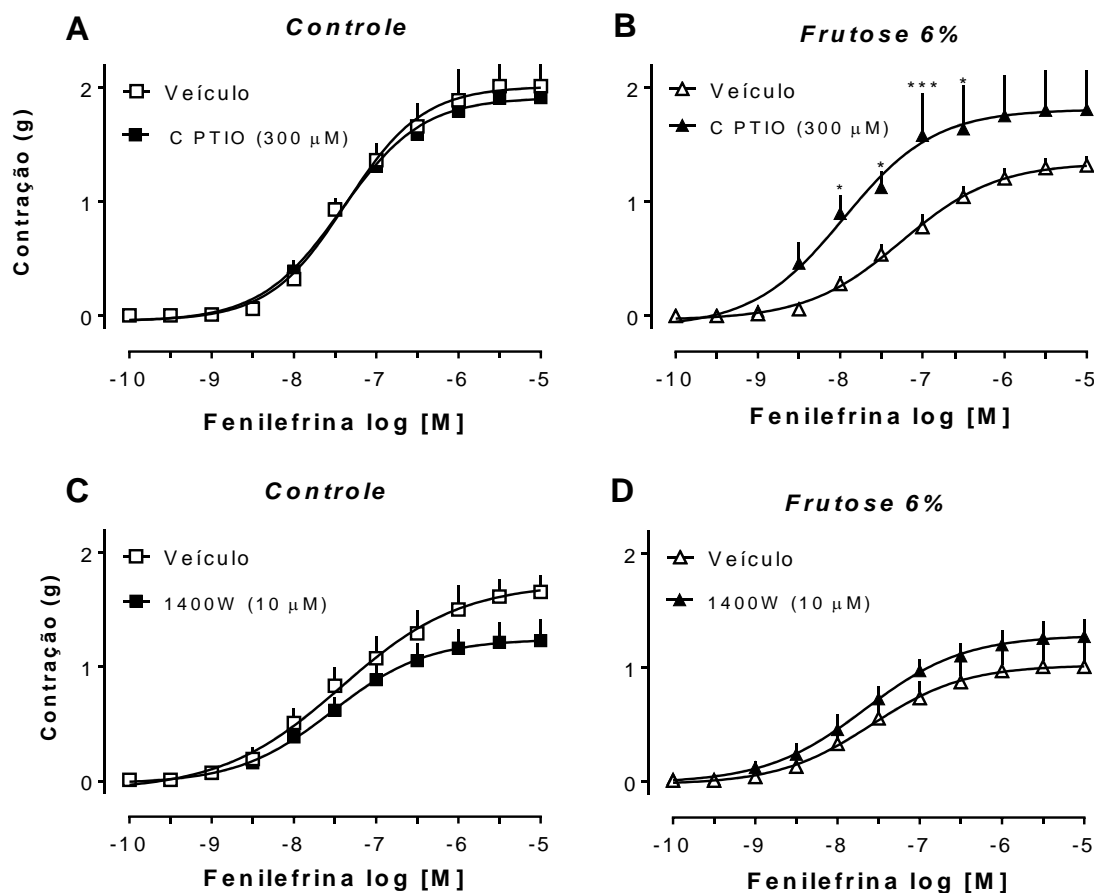


Figura 21. Resposta contrátil induzida pela fenilefrina em aorta na presença do carboxi-PTIO ou do 1400W. Contração em anéis de aorta obtidos de ratos controle e Frutose 6% em resposta à fenilefrina. Em A e B, resposta da fenilefrina na presença de C PTIO, em anéis de aorta do grupo Controle e Frutose 6%, respectivamente; em C e D contração induzida pela fenilefrina em anéis pré-incubados com 1400W, do grupo controle e frutose 6%, respectivamente. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média ($n = 5-6$). A análise estatística entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$, comparado ao veículo.

5.7.5 Ausência da participação de prostanóides na reatividade da aorta de rato do grupo controle e Frutose 6%

Para avaliar a participação de prostanóides os anéis de aorta foram pré-incubados com indometacina ou ibuprofeno, dois inibidores não seletivos da

ciclooxigenase. A Figura 22 mostra que a adição dessas drogas não foi capaz de restaurar a reatividade para fenilefrina no grupo Frutose 6%.

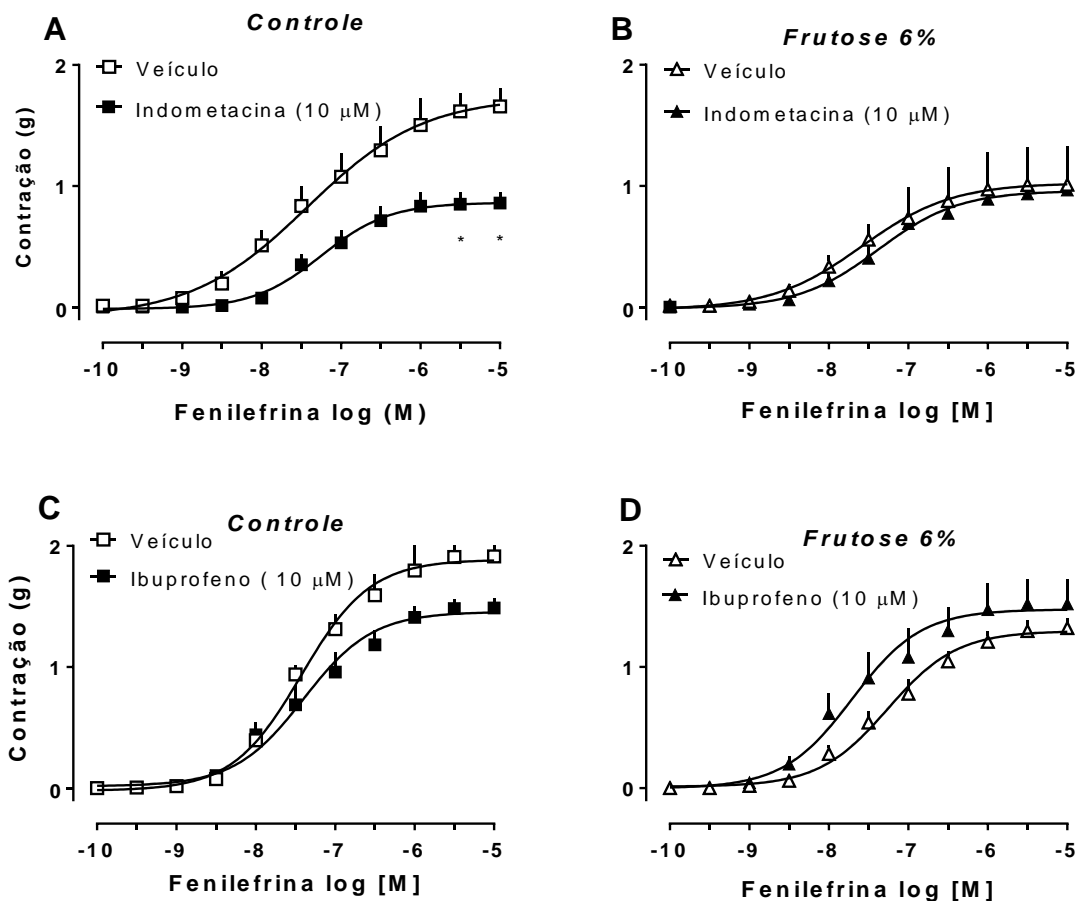


Figura 22. Contração induzida pela fenilefrina na presença de inibidores da produção de prostanoïdes. Curva cumulativa dependente da concentração para fenilefrina em anéis de aorta obtidos de ratos do grupo controle e Frutose 6%. Em A e B, contração induzida pela fenilefrina na presença da indometacina grupos controle e Frutose 6%, respectivamente; em C e D, contração pela adição de fenilefrina em aorta pré-incubada com ibuprofeno, grupos controle e Frutose 6%, respectivamente. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n = 6-8). A análise estatística entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,01$, comparado ao veículo.

5.7.6 Efeito da dieta Frutose 6% na homeostasia do cálcio intracelular e extracelular e da via de sensibilização ao cálcio em aorta de rato

Em preparações com endotélio funcional mantidas em solução nutritiva livre de cálcio, a adição de fenilefrina (1 μ M), resultou em contratilidade reduzida no grupo Frutose 6% ($0,59 \pm 0,14$ g), comparado à resposta obtida no grupo controle ($1,22 \pm 0,15$ g). A remoção do endotélio vascular foi capaz de tornar as respostas induzidas pela fenilefrina iguais nos dois grupos (Figura 23A). Por outro lado a resposta contrátil na ausência de endotélio induzida pela adição de angiotensina II (10 μ M) foi 30 % mais intensa no grupo Frutose 6%, o mesmo foi observado com a adição de cafeína (100 μ M), que resultou em resposta contrátil 80%, maior no grupo Frutose 6%, quando comparado ao controle (Figuras 23C e 23D, respectivamente). Não observamos diferença na expressão da SERCA2 entre os dois grupos mesmo quando as aortas foram estimuladas com a adição de fenilefrina (1 μ M) (Figura 23B).

O efeito contrátil induzido pela adição do cloreto de cálcio a CE_{50} calculada a partir dos dados obtidos na curva concentração resposta mostrou-se deslocada de $5,04 \times 10^{-8}$ ($3,04 - 8,33 \times 10^{-8}$) para $3,12 \times 10^{-8}$ ($1,91 - 5,10 \times 10^{-8}$) nos grupos controle e Frutose 6%, respectivamente (Figuras 23D e 23E), porém a resposta contrátil final não foi diferente entre os dois grupos.

A adição do composto Y-27632, um inibidor da ROCK (1 μ M), reduziu em aproximadamente 50% a contração máxima induzida pela fenilefrina em anéis de aorta dos animais controle (Figura 24A). Entretanto utilizando a mesma concentração de composto Y-27632 não foi capaz de modificar a resposta contrátil para a fenilefrina em anéis de aorta obtidos do grupo Frutose 6% (Figura 24B).

O relaxamento máximo obtido pela adição do composto Y-27632 em anéis de aorta previamente contraídos por fenilefrina foi semelhante em todos os grupos (Figuras 24C e 24D). A dieta Frutose 6% não alterou a expressão de proteína da RhoA (Figura 25A). Mas a expressão da proteína ROCK I (Figura 25B) em aorta de rato exposto à dieta Frutose 6%, está reduzida quando comparado ao rato exposto à ração padrão, grupo controle.

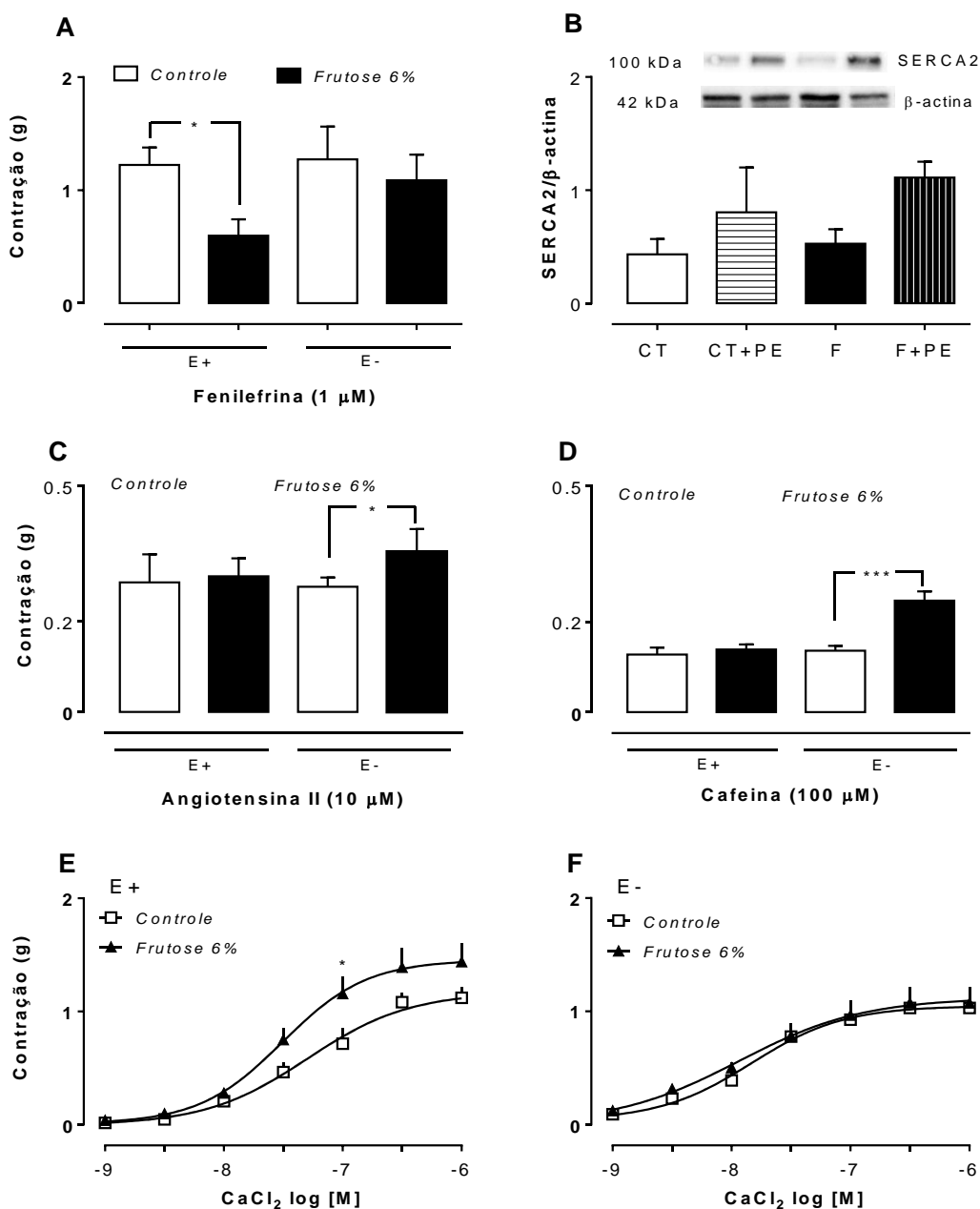


Figura 23. Participação do endotélio na reatividade da aorta em meio livre de cálcio.

Adição de agentes vasoconstritores em preparações de aortas obtidas de ratos controle e Frutose 6%. A) contração induzida pela de fenilefrina na presença e na ausência de endotélio; em B) expressão total da SERCA2; em C), contração induzida pela angiotensina II na presença e ausência de endotélio; em D), resposta contrátil pela adição de cafeína em anéis com e sem endotélio; em E e F, curva concentração resposta pela adição de solução de cloreto de cálcio em preparações com e sem endotélio, respectivamente. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média ($n = 6-8$). A análise estatística entre os grupos foi verificada usando-se o teste t de Student em A, onde $*p < 0,01$ quando comparado ao controle. E em C e D análise de variância (ANOVA) de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni. $*p < 0,01$ e $***p < 0,001$ quando comparado ao controle. Em E e F análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni. $*p < 0,01$ quando comparado ao controle.

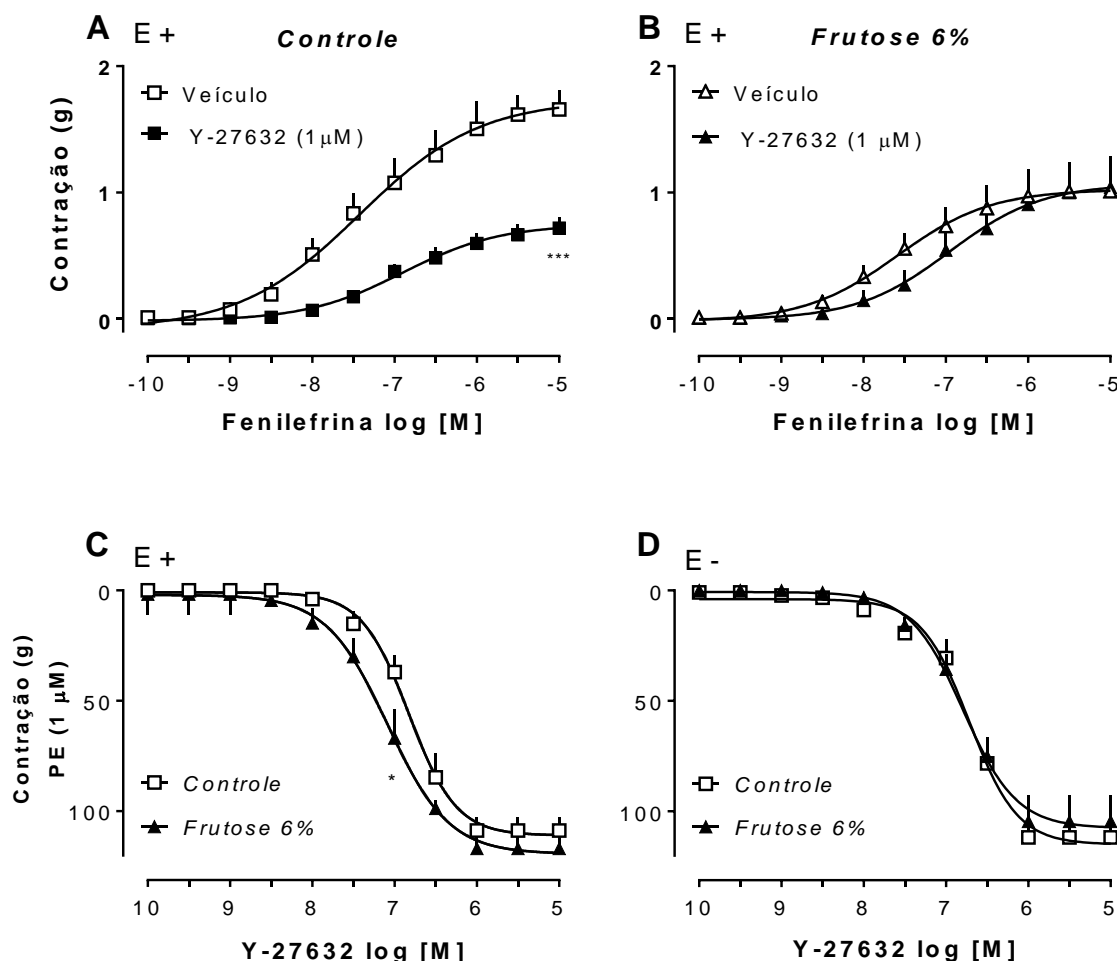


Figura 24. Efeito do composto Y-27632 sobre a reatividade de anéis de aorta. Em A) reatividade da aorta de animais controle na presença do inibidor da ROCK; em B) resposta contrátil da aorta dos ratos grupo Frutose 6% na presença do inibidor da ROCK. Em C) e D) relaxamento dependente da concentração para o composto Y-27632 em anéis de aorta com e sem endotélio vascular, respectivamente. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média ($n = 6$). A análise estatística entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle e *** $p < 0,001$ quando comparado ao veículo.

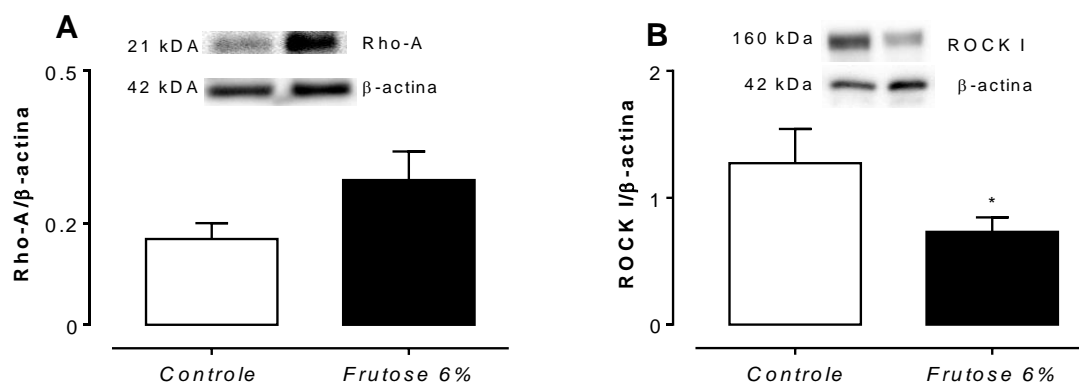


Figura 25. Redução na expressão da ROCK I em aorta de ratos expostos à dieta com Frutose 6%. A expressão da Rho-A em A) e em B) expressão da ROCK I, em aorta isolada de ratos dos grupos controle e Frutose 6%. Os valores foram normalizados pela β -actina em expressos em unidades arbitrárias. Os resultados demonstrados no gráfico apresentam a média \pm o erro padrão da média ($n = 5$). A análise estatística foi feita usando teste t de Student. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.7.7 Participação de canais de potássio na perda de reatividade à fenilefrina em anéis de aorta do grupo Frutose 6%

Para avaliar a participação dos canais de potássio os experimentos foram conduzidos na presença de endotélio. Nossos resultados mostraram que o bloqueador de canais de potássio TEA (Figuras 26A e 26B), assim como a 4-AP (Figuras 26C e 26D), aumentaram a contração induzida pela fenilefrina no grupo Frutose 6% apesar de não terem alterado a reatividade à fenilefrina em anéis do grupo controle. Por outro lado a incubação de glibenclamida ou IbTx potencializou a resposta contrátil para fenilefrina no grupo frutose 6%. O efeito vasoconstritor induzido pela fenilefrina a CE_{50} calculada a partir dos dados obtidos na curva dose resposta, mostrou-se deslocada de $3,45 \times 10^{-8}$ ($1,51 \times 10^{-8} - 7,83 \times 10^{-8}$) para $1,41 \times 10^{-7}$ ($9,09 \times 10^{-8} - 2,20 \times 10^{-8}$) nos grupos controle e Frutose 6%, respectivamente para glibenclamida e para a IbTx CE_{50} $1,39 \times 10^{-8}$ ($7,52 \times 10^{-9} - 2,57 \times 10^{-8}$) para 5,58

$\times 10^{-8}$ ($3,51 \times 10^{-8} - 8,89 \times 10^{-8}$), nos grupos controle e frutose 6%, respectivamente (Figuras 27A, 27B, 27C e 27D).

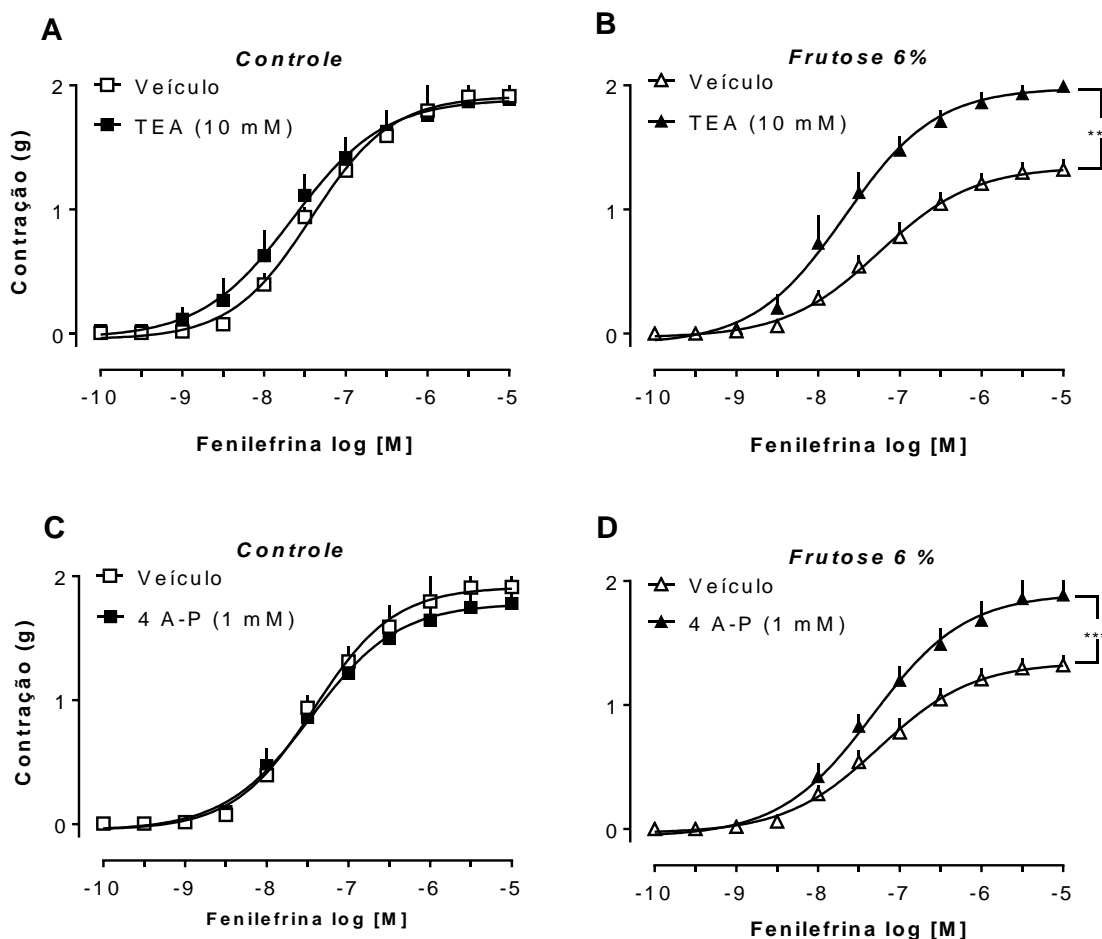


Figura 26. Efeito dos bloqueadores de canais de potássio na reatividade da aorta para fenilefrina em aorta de rato exposto a dieta com Frutose 6%. Contração dos anéis de aorta dos grupos controle e Frutose 6% na ausência e na presença do TEA em A) grupo controle e em B) grupo frutose 6%. Em C) resposta para a fenilefrina no grupo controle na presença da 4-AP, e em D) resposta para a fenilefrina do grupo Frutose 6% na presença da 4-AP. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média ($n = 6-8$). A análise estatística foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$, comparado ao veículo.

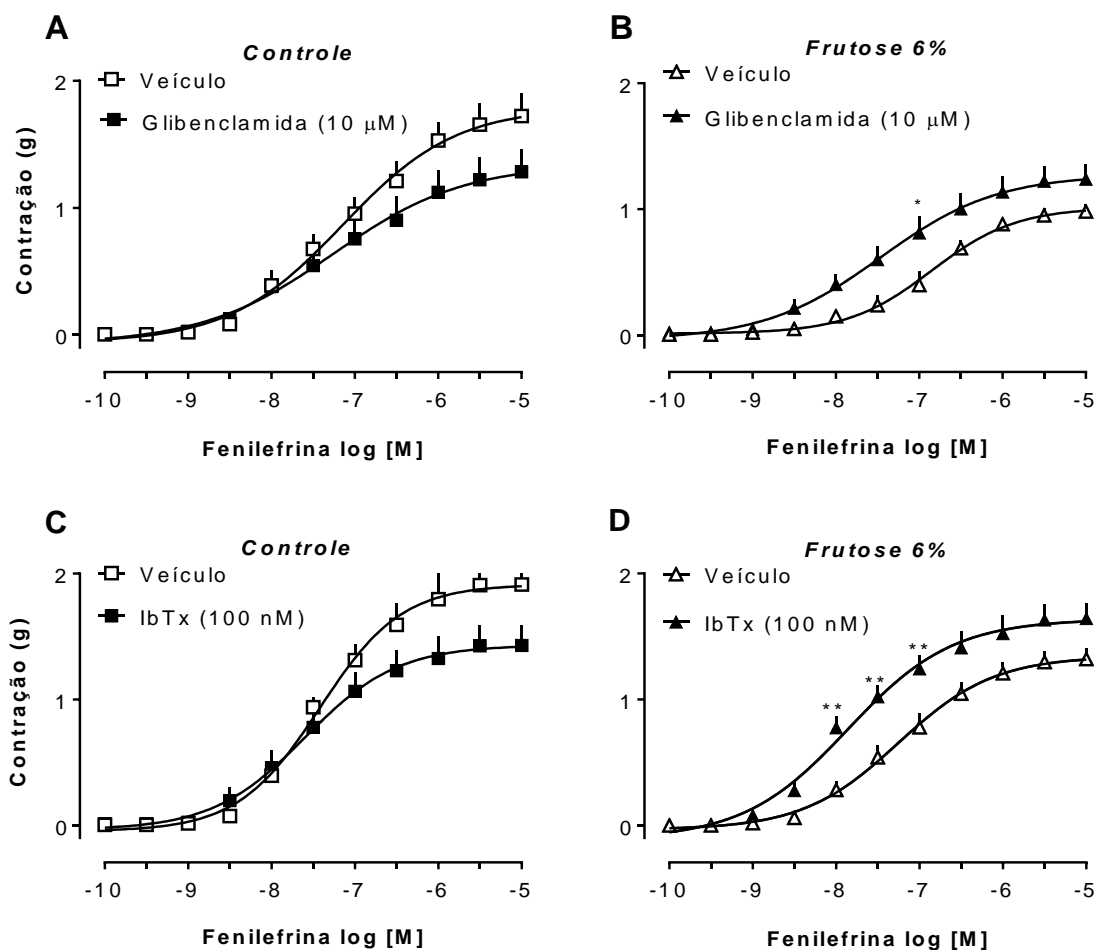


Figura 27. Efeito dos bloqueadores de canais de potássio na reatividade da aorta de rato com dieta Frutose 6% para fenilefrina. Contração dos anéis de aorta dos grupos controle e Frutose 6% na presença da glibenclamida em A e B, respectivamente; e em C e D, contração induzida pela fenilefrina na presença da iberiotoxina, em aorta de rato controle e frutose 6%, respectivamente. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média ($n = 6-8$). A análise estatística foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ quando comparado ao veículo.

5.7.8 Influência das espécies reativas de oxigênio na hiporreatividade para fenilefrina em aorta de rato do grupo Frutose 6%

A adição de tempol, sequestrador de ânion superóxido, foi capaz de reverter a hipocontratibilidade nas aortas do grupo Frutose 6% (Figura 28B) sem modificar a resposta no grupo controle (Figura 28A). Contudo, quando utilizamos a SOD, também um sequestrador de ânion superóxido não observamos modificação na

resposta do grupo Frutose 6% nem do grupo controle (Figuras 28D e 28C, respectivamente).

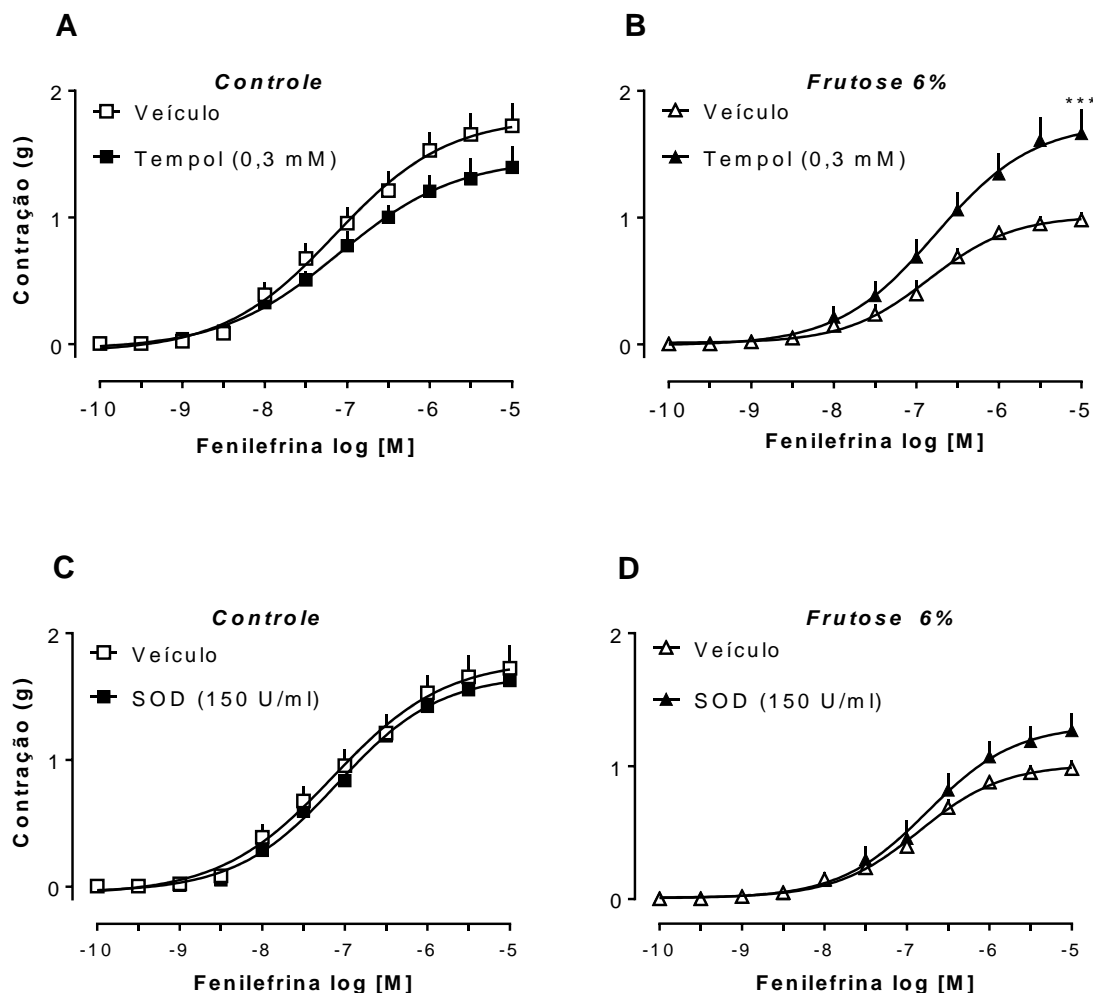


Figura 28. Efeito da inibição da produção de ânion superóxido na reatividade vascular para fenilefrina em aorta de ratos do grupo controle e Frutose 6%. Contração induzida pela fenilefrina em aortas de ratos dos grupos controle e Frutose 6% após a incubação com: Tempol em A e B; em C e D contração da fenilefrina na presença do SOD. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média ($n = 6-8$). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ quando comparado ao veículo.

A utilização da apocinina, um inibidor da NADPH oxidase e também sequestrador de O_2^- , reverteu a hipocontratilidade para fenilefrina na aorta do grupo

Frutose 6% (Figura 29B), sem modificar a resposta contrátil no grupo controle (Figura 29A).

A adição da Peg-catalase, que reduz os níveis de H_2O_2 , nas concentrações utilizadas neste estudo, não alteraram a contração induzida pela fenilefrina nas aortas do grupo Frutose 6% (Figura 29D), e nas aortas do grupo controle (Figura 29C).

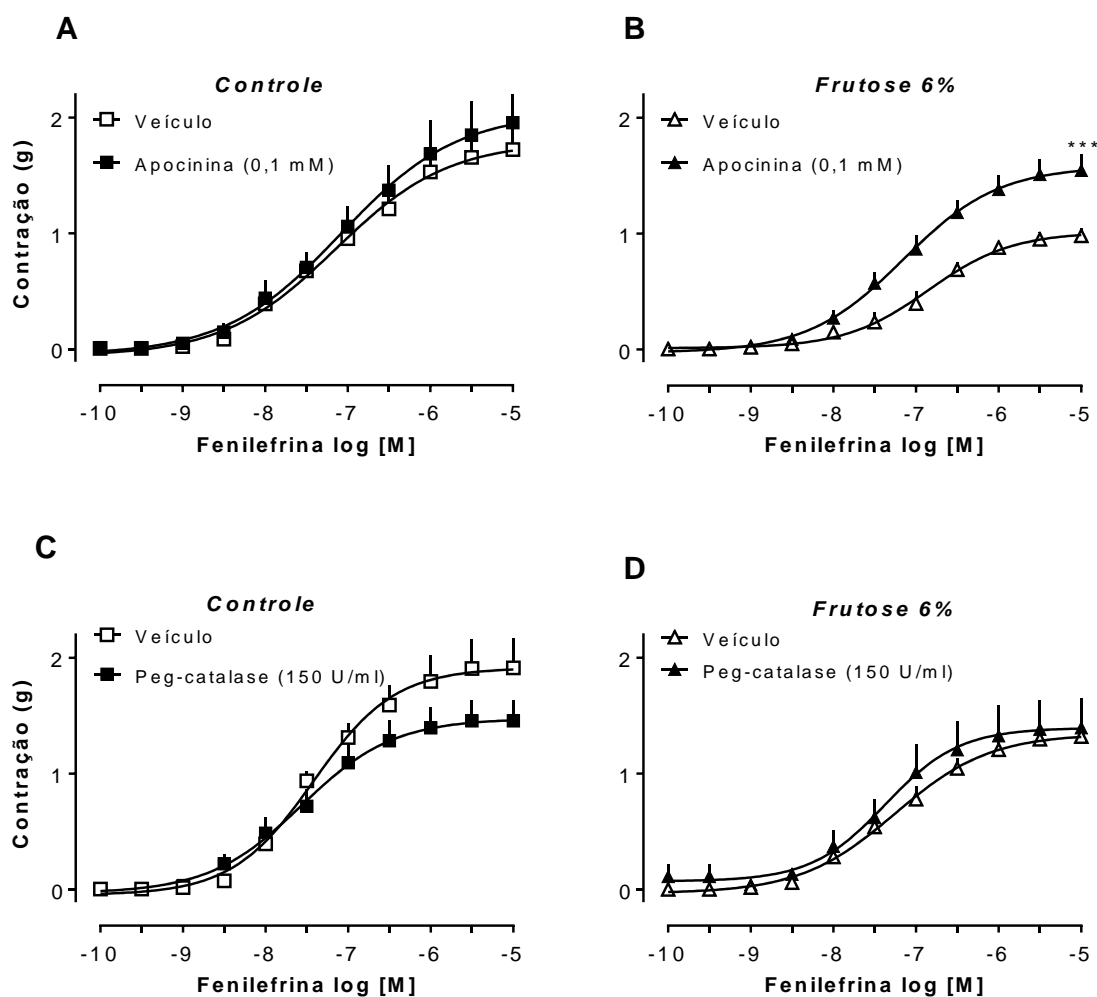


Figura 29. Ausência de efeito da SOD e da Peg-catalase na contração induzida pela fenilefrina em aorta de ratos do grupo controle e Frutose 6%. Em A, e B, contração induzida pela fenilefrina na presença da Apocinina em aorta de ratos controle e Frutose 6%, respectivamente. Em C e D, contração da fenilefrina na presença da Peg-catalase, em aorta do grupo controle e Frutose 6%, respectivamente. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média ($n = 6-8$). As análises foram obtidas pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$, quando comparado ao veículo.

5.8 Níveis da atividade enzimática e não enzimática das defesas antioxidantes em aorta de ratos dos grupos Controle e Frutose 6%

Apesar de não observarmos qualquer diferença na atividade da catalase, glutathione-S-transferase e nos níveis da glutathione peroxidase entre os grupos controle e Frutose 6%, observamos uma redução significativa na atividade da enzima superóxido dismutase e nos níveis da glutathione reduzida no grupo Frutose 6%. Além disso, os níveis de hidroperóxidos lipídicos encontram-se aumentados em aorta de rato do grupo Frutose 6% (Tabela 4).

Tabela 4. Nível da atividade enzimática e não enzimática das defesas antioxidantes em aorta de rato dos grupos controle e Frutose 6%

	<i>Controle</i>	<i>Frutose 6%</i>
SOD (U/mg proteína)	0,76 ± 0,08	0,58 ± 0,01 ^b
GST (nmol/mg proteína)	2,19 ± 0,37	1,54 ± 0,14
GPx (nmol/mg proteína)	10,97 ± 2,63	26,83 ± 7,58
CAT (μmol/min/mg proteína)	0,71 ± 0,22	0,61 ± 0,10
GSH (nmol/mg proteína)	36,96 ± 4,46	22,85 ± 6,48 ^a
LOOH (μmol/mg tecido)	54, 27 ± 5,79	74,84 ± 4,72 ^a

As análises foram feitas em aortas do grupo controle e Frutose 6%. Os resultados estão expressos como a média ± erro padrão da média. A análise estatística entre os grupos foi verificada pelo teste *t* de Student ^a*p* < 0,05 e ^b*p* < 0,01 quando comparada ao controle.

SOD, superóxido dismutase; GST, Glutathione-S-transferase; GPx, Glutathione peroxidase; CAT, catalase; GSH, glutathione reduzida; LOOH, Hidroperóxidos lipídicos.

6. DISCUSSÃO

A hipertensão é uma desordem complexa e multifatorial. Evidências sugerem que a hipertensão se desenvolve por uma combinação de fatores genéticos associados a fatores do estilo de vida, dentre os quais a dieta, que se destaca como um fator capaz de afetar diretamente a pressão arterial. O estilo de vida dito como “ocidentalizado” inclui o consumo de alimentos processados e *fast foods* que contêm grandes quantidades de sal e açúcar (VASDEV *et al.*, 2007b). Em nosso trabalho investigamos o efeito da ingesta crônica de quantidades moderadas de NaCl 4%, de Frutose 6%, e da associação de NaCl 4%/Frutose 6%, na pressão arterial e na reatividade de alguns leitos vasculares de ratos.

Os altos níveis séricos de creatinina encontrados no grupo NaCl 4%/Frutose 6% estão entre os primeiros dados interessantes neste estudo, uma vez que a creatinina é considerada um indicador da função renal (TSIKAS *et al.*, 2010). Em nosso estudo, na sexta semana observamos aumento na massa do rim (peso seco e úmido) em ratos dos grupos NaCl 4% e NaCl 4%/Frutose 6%. Embora nosso estudo não tenha sido desenhado para explorar essa questão, buscamos interpretar esses resultados da melhor maneira possível. Nakayama e colaboradores (2010) demonstraram que o consumo excessivo de frutose (60%) causou aumento na massa renal e dano tubulointersticial em rim de ratos normais, e esse dano ocorre por proliferação das células do túbulo proximal que expressam a frutocinase, enzima responsável por metabolizar a frutose (NAKAYAMA *et al.*, 2010), causando a hiperplasia. Estudos mostraram que o excesso de NaCl (8%), aumenta a expressão dos componentes do SRA no córtex renal (WU *et al.*, 2014), e níveis elevados de Angiotensina II não só contribuem para o aumento da pressão arterial como leva ao desenvolvimento da glomeruloesclerose, fibrose intersticial culminando com dano renal (MULLER *et al.*, 2002). Além disso, a associação de sódio e frutose (20%) a longo prazo aumenta a atividade do NHE e sensibiliza o túbulo proximal à Angiotensina II (CABRAL *et al.*, 2014).

Nossos resultados sugerem que o aumento de peso observado no rim não ocorre somente pelo acúmulo de líquido (edema), mas pode ser também por alterações estruturais, como por exemplo, hipertrofia ou hiperplasia. Níveis séricos de creatinina elevados também foram observados em modelo experimental onde ocorreu a associação de sódio (8% na dieta) e frutose (10% na água) (TSIKAS *et al.*,

2010; YANG, Y. *et al.*, 2015). Porém, ainda não há um consenso na literatura sobre os níveis de creatinina que efetivamente indicam dano renal (HEWITT *et al.*, 2004), uma vez que as concentrações de creatinina sérica podem ser influenciadas também por mudanças na massa muscular.

Outro dado interessante foi o aumento no número de plaquetas no grupo NaCl 4%/frutose 6% comparado ao grupo controle. Entretanto, neste trabalho não podemos inferir se este resultado está relacionado à dieta, seriam necessários mais estudos para observarmos se este aumento permanece.

Apesar de a frutose fornecer aproximadamente 4 Kcal/g (SCHAEFER *et al.*, 2009), a dieta acrescida de Frutose 6% não foi suficiente para aumentar o peso corpóreo dos animais. De maneira interessante o grupo NaCl 4%/Frutose 6% consumiu menor quantidade de ração, que foi acompanhado de menor ganho de peso. Porém, os grupos NaCl 4%/Frutose 6% e NaCl 4% consumiram mais água e, conseqüentemente, tiveram o volume urinário elevado. Em condições fisiológicas os rins adaptam sua excreção de sal e água para promover o equilíbrio hemodinâmico. Quaisquer alterações nas concentrações de NaCl aumenta a osmolaridade que é percebida pelos osmoreceptores (ARSENIJEVIC; BAERTSCHI, 1985) que tem como reflexo a ativação do centro da sede, para aumento da ingestão de água que é rapidamente absorvida. Simultaneamente ocorre a liberação do hormônio antidiurético (vasopressina), principalmente se a água não for rapidamente encontrada, a ativação do mecanismo da sede promove aumento no volume de líquido extracelular, reduzindo a osmolaridade. O rim responde a esta mudança na intensidade do fluxo do líquido (MCKINLEY *et al.*, 1978; THORNTON, 2010). Esse efeito observado em nosso estudo pode ser um mecanismo de diurese por pressão.

Os níveis séricos de ácido úrico e glicemia são parâmetros importantes relacionados ao metabolismo da frutose. Ratos expostos à dieta frutose (60%) desenvolvem resistência à insulina, obesidade e hiperuricemia (HWANG *et al.*, 1987; NAKAGAWA *et al.*, 2006). Em nosso modelo experimental os níveis séricos de ácido úrico e glicemia não apresentaram alterações, permaneceram semelhantes entre todos os grupos.

Esse conjunto de dados nos mostra que a adição de frutose 6% à dieta no período de 6 semanas não resultou em ganho de peso e nem modificou parâmetros metabólicos importantes, o que ocorre em outros modelos de hipertensão induzida pela frutose (60%), sugerindo que nosso modelo experimental pode ser utilizado

para investigar a influência do consumo de NaCl 4% e de Frutose 6% na pressão arterial, sem a influência de acúmulo de gordura, obesidade ou diabetes anomalias associadas à hipertensão e à síndrome metabólica.

Apesar do consumo elevado de sal estar relacionado ao aumento da pressão arterial, em nosso estudo os ratos com dieta acrescida de NaCl 4% não apresentaram alterações na pressão arterial. Do mesmo modo os ratos que consumiram a ração somente com o acréscimo de Frutose 6%, também não apresentaram alterações na pressão arterial basal, mensurada pelo método direto. Entretanto nossos dados indicaram que associação de quantidades moderadas de NaCl 4% e Frutose 6% elevam a pressão arterial, confirmando a nossa hipótese. Os resultados até aqui demonstram, pela primeira vez, que a associação de quantidades moderadas de sódio 4% e frutose 6% quando consumidas cronicamente desde o desmame, apesar de não modificar parâmetros metabólicos, elevam a pressão arterial. Além disso, os ratos do grupo NaCl 4%/Frutose 6% além de apresentarem níveis pressóricos basais mais elevados, também tiveram respostas hipertensora mais intensas para a angiotensina II. E de maneira interessante o grupo exposto à frutose 6% apresentou uma resposta reduzida para fenilefrina em relação ao controle e reduzida para vasopressina em relação ao grupo NaCl 4%/Frutose 6%. Dados literários mostram uma forte correlação entre o aumento no consumo de frutose (60%) e aumento na absorção de sal no jejuno e no túbulo renal, e indicam que o transportador de frutose (GLUT5) e o transportador de ânion, estão envolvidos neste processo (SINGH *et al.*, 2008; SOLEIMANI; ALBORZI, 2011). Sendo assim, o aumento na absorção de sódio, por ação da frutose, pode levar à sobrecarga de sódio e refletir na pressão arterial. A frutose pode impedir a manutenção do equilíbrio osmótico por aumentar a reabsorção de sódio no túbulo proximal, e consequentemente contribuindo para a elevação da pressão arterial. Além disso, resposta hipotensora induzida pela bradicinina foi mais intensa na dose de 60 nmol/kg para o grupo NaCl 4%/Frutose 6%. A bradicinina assim como a acetilcolina leva a um aumento na produção de substâncias vasodilatadoras como o NO pelas células endoteliais, via ativação da NOS-III, e talvez possa ocorrer um aumento na produção de NO o que poderia explicar a resposta sistêmica mais intensa para a bradicinina.

Apesar da ausência da elevação da pressão arterial média (PAM) em animais anestesiados do grupo exposto à Frutose 6%, quando a pressão arterial sistólica

(PAS) foi acessada por plestimografia tanto a PAS como a frequência cardíaca foram significativamente maiores no grupo Frutose 6% (em anexo artigo submetido). O mesmo ocorreu com os animais do grupo NaCl 4%/frutose 6% quando comparada com a pressão arterial e frequência cardíaca dos ratos que consumiram somente ração padrão. O aumento observado pode ser em decorrência do estresse imposto pela contenção do animal ou mesmo por comprometimento do controle da resistência vascular, pois em ratos com dieta frutose (60%) com a atividade simpática bloqueada (simpatectomia química) não ocorre o desenvolvimento da hipertensão (VERMA *et al.*, 1999), sugerindo que a atividade simpática pode estar envolvida no desenvolvimento da hipertensão em ratos frutose (60%). Sugere-se que o uso de um bloqueador β -adrenérgico como o propranolol, por exemplo, o aumento na frequência cardíaca observado é atenuado (SCHWARZ *et al.*, 1992).

Em nosso estudo não avaliamos a pressão arterial por telemetria, neste procedimento os ratos não precisam ser contidos e os animais são mantidos em condições sem nenhuma perturbação. Assim, qualquer variação na pressão arterial nas 24 h é atribuída à variação sem interferência do observador. Por outro lado, na mensuração pelo método *tail-cuff* o rato é contido e aquecido. Essa manipulação impõe estresse sobre os animais, levando ao aumento da atividade simpática, e este pode ser o estímulo para desmascarar a hipertensão, em decorrência de estresse físico gerado pela contenção do rato. Além disso, em muitos casos, a pressão arterial periférica reflete a soma da pressão central mais a periférica (conhecido como “aumento periférico”), por isso a pressão sistólica periférica, como a mensurada por *tail-cuff*, pode ser mais elevada que a pressão central, como a mensurada por telemetria, com transdutor na aorta ou carótida. Este mesmo efeito ocorreu com a infusão contínua de angiotensina II (5 ng/Kg/min), potente vasoconstritor. Foi observado que a infusão contínua com AII não causa uma hipertensão sustentada quando acessada por telemetria, porém causa uma resposta hipertensora exacerbada quando os animais são submetidos à mensuração por *tail-cuff* (BROWN, A. J. *et al.*, 1981; DICKINSON; LAWRENCE, 1963; ORTIZ *et al.*, 2001; PELAEZ *et al.*, 2003).

Os nossos resultados da PAS demonstram pela primeira vez que quantidades moderadas de Frutose 6% adicionados à dieta podem elevar a pressão arterial de ratos. Apesar de existirem poucas evidências da frutose causar alterações na frequência cardíaca em estudos experimentais e na clínica (LE *et al.*, 2012;

ZEMANCIKOVA; TOROK, 2014), encontramos que quantidades moderadas de frutose na dieta (6%) resultou em taquicardia e o mesmo ocorreu em animais que receberam NaCl 4%/frutose 6% na dieta.

Esses novos resultados nos levaram a indagar qual seria a influência da dieta modificada com NaCl 4% e Frutose 6% em outros leitos vasculares que também participam da modulação da pressão arterial, como o leito renal e o leito arterial mesentérico.

O controle da pressão arterial requer a integração de mecanismos complexos em vários sistemas fisiológicos. E o aumento sustentado na pressão arterial reflete na deficiência de um ou mais destes mecanismos de controle da pressão (COFFMAN, 2011; TAKAHASHI *et al.*, 2011). Os rins participam do controle da pressão arterial, e a habilidade de manejo de sódio pelos rins é determinante na elevação da pressão arterial (COFFMAN, 2014). Em nosso modelo experimental a dieta modificou a pressão de perfusão vascular renal basal nos grupos tratados com dieta NaCl 4% e NaCl 4%/Frutose 6% e todos os grupos apresentaram hiper-reatividade para fenilefrina. Em modelo experimental onde os ratos são expostos à dieta *high-salt*, os animais tendem a compensar o excesso de sódio por ingestão de volumes maiores de água (LATTA; LEE, 1983). O maior consumo de água leva à expansão no volume extracelular com aumento no débito cardíaco, e ao rim cabe o ajuste para restaurar o equilíbrio de fluídos no corpo, regulando a excreção de sódio e água. Além do desajuste na hemodinâmica, acredita-se que o consumo excessivo de sódio promova alterações que não estão relacionadas ao aumento na pressão arterial, como por exemplo, a hipertrofia cardíaca, disfunção endotelial, estresse oxidativo e dano renal (FARQUHAR *et al.*, 2015; KITIYAKARA *et al.*, 2003; YU *et al.*, 1998). De acordo com este princípio fica claro que alterações a longo prazo na hemodinâmica e na pressão arterial, não ocorrem sem a participação do rim. A frutose, por sua vez, além de aumentar a absorção de sal pode por si só também causar dano renal. Porém, vale ressaltar que até o momento os trabalhos relacionam apenas grandes quantidades de frutose (60%) com o dano renal (NAKAYAMA *et al.*, 2010). Em nosso estudo quantidades moderadas de Frutose 6% já foram suficientes para produzir uma hiper-reatividade vascular no rim. É possível que a frutose, que chega ao rim pela urina é absorvida, mais especificamente no segmento S3, levando a alterações locais como o estresse oxidativo (CIRILLO *et al.*, 2009). Além disso, as células renais metabolizam a frutose no rim formando seus

metabólitos. Em alguns experimentos onde são utilizadas concentrações supra-fisiológicas de frutose as respostas metabólicas são mais robustas, porém, em caráter de magnitude são similares às respostas observadas quando são utilizadas doses moderadas de frutose, como por exemplo, 6% (CIRILLO *et al.*, 2009). Como a pressão arterial é modulada a longo prazo pelos rins, é de se supor que alterações na funcionalidade renal possam refletir diretamente na pressão arterial. Apesar de não nos aprofundarmos nos danos renais podemos sugerir que o consumo de NaCl 4% e NaCl 4% associado à Frutose 6% causam alterações na função/morfologia renal que culminaram com a elevação da pressão de perfusão renal e este efeito pode refletir no aumento da pressão arterial observada no grupo que foi exposto à dieta NaCl 4%/Frutose 6%.

Juntamente com o rim, o leito vascular mesentérico (LVM) produz resistência vascular para desenvolver pressão sanguínea e regular o fluxo de sangue para os tecidos, tendo participação importante na manutenção da pressão arterial sistêmica. A pressão de perfusão basal no leito mesentérico não foi diferente entre os grupos. Entretanto, a exposição contínua a dietas Frutose 6%, ou NaCl 4%/Frutose 6%, tornou o LVM hipo-reativo tanto para fenilefrina como para a vasopressina. A regulação da pressão arterial, quando elevada, acontece com a redução da resistência vascular periférica em combinação com a redução do débito cardíaco e/ou redução do volume extracelular. O leito vascular mesentérico é rico em artérias de resistência, portanto a circulação mesentérica possui papel importante na manutenção da pressão arterial sistêmica (MULVANY; AALKJAER, 1990). A preservação da funcionalidade do endotélio vascular no LVM é fundamental para o relaxamento. O LVM quando perfundido com agonista α_1 -adrenérgico induz uma contração sustentada que decresce ao longo de 180 min. Porém quando o endotélio vascular é removido a contração permanece ao longo dos 180 min, sugerindo que o endotélio desempenha um papel importante na inibição da contração induzida através da liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio (JIN *et al.*, 2011). A regulação do tônus vascular pelo LVM é mantida principalmente pela liberação do EDHF, que está envolvido com a ativação de canais de K^+ . Em pequenas artérias de resistência o EDHF é considerado o maior participante na resposta para substâncias vasoativas (MULVANY; AALKJAER, 1990; SCOTLAND *et al.*, 2001; SHIMOKAWA *et al.*, 1996). Embora não tenhamos nos aprofundado nos mecanismos responsáveis pela hipo-reatividade do LVM, é possível especular que alterações na produção e

liberação de fatores relaxantes derivados de endotélio no LVM, possam comprometer a reatividade vascular do leito mesentérico.

Estudos biológicos com animais são desenvolvidos para o entendimento das alterações na pressão arterial. São utilizados vários leitos vasculares como o renal, mesentérico, e artérias de resistência. Embora a artéria aorta não participe efetivamente do controle da pressão arterial, o estudo neste vaso contribui para a compreensão dos mecanismos celulares envolvidos nas patologias.

Para entender melhor as implicações destes resultados prosseguimos nosso trabalho investigando o efeito das diferentes dietas na reatividade vascular em preparações de aorta isolada de rato.

Em nossos experimentos observamos que da mesma forma que no LVM, os anéis de aorta de ratos do grupo Frutose 6% apresentaram hipo-reatividade para fenilefrina, um agonista $\alpha 1$ -adrenérgico. Alguns fatores podem estar envolvidos na redução da resposta contrátil para fenilefrina em aorta de ratos do grupo Frutose 6%. Os ratos expostos à Frutose 6% apresentaram aumento na pressão arterial, portanto a resposta reduzida para fenilefrina, embora a princípio surpreendente e inesperada, pode ocorrer por alterações funcionais compensatórias em resposta à mudanças na hemodinâmica. De forma bastante interessante, com a remoção do endotélio vascular a hipo-reatividade não foi mais observada (ver Figuras 16A e 16B), sugerindo que em vasos de animais do grupo Frutose 6%, mediadores liberados pelo endotélio modularam negativamente a resposta contrátil à fenilefrina, de forma mais intensa do que a já descrita e bem conhecida ação que fatores relaxantes derivados do endotélio (ex. NO, PGI_2) exercem se contrapondo a eventos vasoconstritores (ex. tônus simpático).

Em um primeiro momento poderíamos pensar que a contratilidade reduzida para fenilefrina seria uma resposta benéfica para o vaso. Entretanto, quando avaliamos a resposta da aorta para a acetilcolina (ACh), um agonista de receptores muscarínicos M_3 (acoplado a proteína Gq) nas células endoteliais, muito utilizado experimentalmente para avaliar a função endotelial e o relaxamento dependente de endotélio, mostrou-se menos potente para induzir relaxamento nas aortas do grupo Frutose 6% (ver Figura 15A). Por outro lado, o oposto foi observado quando utilizamos o nitroprussiato de sódio (SNP), um doador de NO, que teve seu efeito potencializado nas aortas do grupo Frutose 6% na presença do endotélio.

A estimulação do endotélio vascular pela ACh em condições fisiológicas ativa a enzima NOS-III a produzir o NO que promove suas ações nas células do músculo liso vascular, porém quando o endotélio é exposto a fatores de risco como, por exemplo, tabagismo, consumo excessivo de álcool, etc, o endotélio tenta manter a produção de NO para a proteção do endotélio. Entretanto, quando os fatores de risco permanecem, o endotélio passa a produzir o ânion superóxido que reage com o NO e forma o peroxinitrito reduzindo a proteção vascular. Neste caso reduzindo a relaxamento induzido pela ACh. Em nosso estudo evidenciamos uma resposta reduzida para a ACh no grupo Frutose 6% e quando observamos a resposta potencializada pelo nitroprussiato de sódio, que é um doador de NO, podemos entender que o NO produzido não está sendo utilizado para a ativação da GCs, essa via menos ativa pode estar mais expressa, o que justificaria a potencialização da resposta ao SNP/NO.

Nossos resultados evidenciam que as alterações mais interessantes acontecem com os ratos expostos à dieta Frutose 6%. Com esse tratamento os ratos ficaram hipertensos e apresentaram hipo-reatividade para fenilefrina e ACh, sugerindo contribuição do endotélio vascular nestas respostas. Considerando as alterações anteriormente descritas o nosso estudo foi continuado apenas com o grupo Frutose 6%. Mais uma vez reforçando a participação do endotélio vascular, verificamos hipo-reatividade dos anéis de aorta do grupo Frutose 6%, tanto para angiotensina I, como para angiotensina II. Do mesmo modo com a remoção do endotélio vascular a resposta contrátil do grupo Frutose 6% se equiparou à resposta obtida no grupo controle. Nossos resultados sugerem que o endotélio vascular da artéria aorta do grupo Frutose 6% apresenta uma produção maior de NO, e que possa ser o efector da hipo-reatividade encontrada. Além disso, a artéria carótida com endotélio funcional dos animais expostos à dieta frutose 6% também foi hipo-reativa tanto para fenilefrina como para a angiotensina II. A artéria carótida, e a aorta são artérias elásticas e possuem uma produção basal de óxido nítrico maior que nos vasos musculares como a artéria femoral e mesentérica (LELOUP *et al.*, 2015). Até o momento nossos resultados sugerem que em artéria aorta de animais expostos à dieta frutose 6% possa ocorrer uma produção basal maior de NO, e que este aumento na produção basal de NO possa atenuar a contração induzida pela adição de fenilefrina.

Neste momento lembramos que a hipótese principal do nosso trabalho seria de que a associação de NaCl 4% com Frutose 6% à dieta de ratos por 6 semanas elevaria a pressão arterial, o que foi observado. Entretanto, no decorrer do nosso estudo os resultados obtidos nos indicaram que a Frutose 6% sozinha também foi capaz de elevar a pressão arterial e a frequência cardíaca, e que seu consumo isoladamente, também tem consequências sobre a biologia vascular.

A participação do NO na hipo-reatividade para a fenilefrina em aorta de animais do grupo exposto à dieta com Frutose 6% foi investigada com o uso de drogas que inibem a síntese ou que removem o NO do ambiente celular, como o L-NAME (um inibidor não seletivo das isoformas de NOS), e o ODQ (inibidor da guanilato ciclase solúvel), foram capazes de restaurar a contração induzida pela fenilefrina no grupo Frutose 6%. O aumento na resposta contrátil induzida pela fenilefrina em anéis de aorta com endotélio na presença do L-NAME tornou-se semelhante à obtida em anéis de aorta sem endotélio vascular, o que sugeriu a participação da via NO/GCs na hipo-reatividade.

A NOS-II é induzida por estímulos imunológicos, e apesar de todas as isoformas de NOS precisarem de Ca^{2+} /calmodulina para serem ativadas, a NOS-II possui alta afinidade pela calmodulina e permanece ligada a ela, mesmo em baixas concentrações de cálcio o que lhe confere alta atividade catalítica. Sendo assim a NOS-II produz uma grande quantidade de NO de maneira contínua, até que os substratos se tornem limitados (GROSS; WOLIN, 1995). Nestas circunstâncias o NO produzido pode causar dano tecidual e até morte celular. A hipotensão que ocorre durante a sepse induzida por lipopolissacarídeo está associada à indução NOS-II, e o bloqueio da NOS-II pelo 1400W nessas condições reverteu a hipotensão (WRAY *et al.*, 1998) e aumentou a resistência periférica e o débito cardíaco em estudos pré-clínicos (CHENG *et al.*, 2003). Tendo em vista estudos que demonstraram que a perfusão de coração de ratos saudáveis por 2 h com uma solução nutritiva acrescida de glicose (33,3 mmol/L) aumentou a expressão de mRNA da NOS-II, elevando a produção de óxido nítrico e superóxido, e induzindo apoptose das células cardíacas (CERIELLO *et al.*, 2002), investigamos se em nosso trabalho se a hiporreatividade observada poderia ocorrer por aumento na produção de NO por ativação da NOS-II. Para isso usamos o 1400W, um inibidor seletivo da NOS-II (GARVEY *et al.*, 1997). Entretanto, em nosso estudo a adição do 1400W não modificou a resposta contrátil induzida pela fenilefrina no grupo Frutose 6%, e nem no grupo controle, indicando

que em nosso estudo, ao menos em vaso como a aorta, a NOS-II não participa da hipo-reatividade para fenilefrina.

Com esses resultados tornou-se interessante avaliar se o uso de um sequestrador de NO poderia reverter a hipo-reatividade encontrada. Os PTIOs são compostos que reagem com o NO para formar nitratos e nitritos, e são considerados monitores de NO, ou seja, a formação de nitrato e nitrito indica a presença do NO (AKAIKE *et al.*, 1993; HOGG *et al.*, 1995; JOSEPH *et al.*, 1993). O PTIO ou C-PTIO (análogo do PTIO solúvel em água) é oxidado pelo NO. Na presença do C-PTIO a contração induzida pela fenilefrina foi mais potente em aorta de rato exposto à Frutose 6%, indicando que o C-PTIO reagiu com o NO produzido. Com esse bloco de resultados podemos sugerir que ocorre aumento na produção de NO, ou de seus metabólitos, produzidos em aorta de ratos tratados com dieta Frutose 6% e que provavelmente não são provenientes da ativação da NOS-II, mas sim da NOS-III. Nossos resultados indicam que a redução na reatividade vascular a constritores depende da produção do NO.

Além do NO, os metabólitos do ácido araquidônico como a prostaciclina (PGI_2) e tromboxano A_2 (TXA_2) têm papel essencial na manutenção da homeostasia vascular. A PGI_2 e o TXA_2 são produtos do metabolismo do ácido araquidônico pela ação da ciclooxigenase (COX). São conhecidas duas isoformas de COX, a COX-1, que é expressa constitutivamente na maioria das células, e a COX-2, que é induzida por estímulos inflamatórios como endotoxinas bacterianas e citocinas.

Em nosso estudo observamos que tanto a adição da indometacina como do ibuprofeno (dois inibidores não seletivos da enzima COX) não modificou a resposta contrátil para a fenilefrina no grupo tratado com Frutose 6%. Entretanto, para nossa surpresa, verificamos que a presença da indometacina reduziu a resposta contrátil do grupo controle. Esse mesmo padrão de resposta para indometacina no grupo controle foi encontrado por Silva R.B. (2013), na Tese que tem como Título “A resposta contrátil induzida pela fenilefrina é modulada pelo peróxido de hidrogênio em aorta de ratos hipertensos renais”. Esse grupo de estudo sugeriu que no controle a COX endotelial quando não inibida deva contribuir com a produção de um fator contrátil e que esse fator é perdido após sua inibição ou que a COX após sua inibição contribua para potencialização na produção de um fator relaxante. Apesar de o nosso modelo experimental diferir do modelo do grupo de estudo mencionada acima, nossos resultados com a incubação da indometacina em aorta no grupo

controle foram semelhantes. Entretanto trabalhos recentes mostram que a exposição contínua dos vasos ao aumento da pressão arterial como acontece, por exemplo, em animais espontaneamente hipertensos (SHR), torna esse vaso hipo-reativo quando exposto a agonistas α_1 -adrenérgicos (ZHAO *et al.*, 2015), esses receptores são alvo para adrenalina e noradrenalina, mediadores endógenos do sistema nervoso simpático. Os autores sugerem a existência de um “crosstalk” entre receptores α_1 -adrenérgicos e receptores TP (receptores para tromboxano A_2) uma vez que observaram que a contração induzida pela PGE_2 foi reduzida quando a aorta foi pré-contraída pela fenilefrina, em animais SHR, mas não em animais normotensos. A ativação de receptor α_1 -adrenérgicos causou dessensibilização de receptores prostanóides (TP), em aorta de animais SHR e que provavelmente seja em decorrência a uma super expressão da PKC e da β -arrestina 2, e que este mecanismo possa ser de proteção dos vasos em animais espontaneamente hipertensos. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliarmos este resultado interessante.

Estudando a participação do cálcio na contração induzida pela fenilefrina encontramos que a hipo-reatividade em anéis de aorta do grupo Frutose 6% permaneceu na ausência de cálcio do meio extracelular, porém somente na presença de endotélio vascular. Mais uma vez nos indicando uma participação do endotélio vascular. O influxo de cálcio participa da contração do músculo liso vascular. O aumento de cálcio no meio intracelular é finamente controlado para atender a necessidade do músculo liso vascular. Entretanto, o cálcio não ativa diretamente as proteínas do músculo liso vascular. O aumento nas concentrações de cálcio intracelulares resulta em maior ligação deste à calmodulina. O cálcio ligado à calmodulina forma um complexo que ativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), que por sua vez fosforila a cadeia leve da miosina (MLC) possibilitando a interação molecular entre os filamentos de actina e miosina, promovendo a contração do músculo liso vascular (BOLTON, 1979; TAKUWA, 1996). O aumento nos níveis de cálcio livre no citosol pode ocorrer por entrada de cálcio através da abertura de canais de cálcio localizados na membrana após despolarização, ou estimulação por agonistas. A liberação de cálcio dos estoques intracelulares (retículo sarcoplasmático) é uma maneira secundária de aumentar as concentrações de cálcio livre no citosol, e pode ser desencadeada pela ativação de canais conhecidos como receptores rianodina (RyR) (ZUCCHI; RONCA-TESTONI, 1997), ou pela

ligação do IP₃ aos seus receptores (FERRIS; SNYDER, 1992), abrindo os canais e permitindo a liberação do cálcio.

Em nossos resultados na ausência da influência do endotélio funcional essa via se apresentou mais sensível em aorta de rato Frutose 6%. A cafeína em meio livre de cálcio, induziu uma contração transitória pequena que é atribuída à liberação de cálcio dos estoques intracelulares do retículo sarcoplasmático (SATO *et al.*, 1988; WATANABE, C. *et al.*, 1992). Entretanto, a remoção do endotélio aumentou significativamente a resposta contrátil induzida pela cafeína em aorta de rato expostos à dieta frutose 6%. O mesmo ocorreu com a adição da angiotensina II. Mais uma vez nossos resultados demonstram participação do endotélio na resposta contrátil. O endotélio modulando negativamente a contração induzida pela fenilefrina e na ausência de endotélio ocorrendo aumento da resposta contrátil.

Nossos resultados demonstraram que as aortas do grupo Frutose 6% foram mais sensíveis à adição cumulativa de CaCl₂ na presença de endotélio, sugerindo uma possível alteração na entrada de cálcio do meio extracelular.

O relaxamento do músculo liso ocorre com a remoção do estímulo contrátil ou por ação direta de substâncias que inibam o estímulo do mecanismo contrátil. Porém seja qual for o mecanismo envolvido, o relaxamento requer a redução na concentração de Ca²⁺ no meio intracelular e o aumento na atividade da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) (SOMLYO *et al.*, 1999). Dentro das células o cálcio é armazenado no retículo sarcoplasmático (RS) (GABELLA, 1971;1984). A função do RS é contribuir com a homeostasia de cálcio e manter os níveis de cálcio intracelular baixos via ativação da Ca²⁺-ATPase (SERCA). A SERCA é responsável por transportar o Ca²⁺ para dentro do RS, sendo que existem três subtipos de SERCA classificados como 1, 2 e 3. Apesar dos vasos apresentarem os subtipos 2 e 3, a SERCA2 parece ser expressa em maior quantidade/densidade nos mesmos (CARAFOLI, 1987). Em nosso estudo não observamos alterações na expressão e/ou atividade da SERCA2 que possam comprometer o fluxo de cálcio do citosol para o retículo sarcoplasmático, mesmo quando as aortas foram estimuladas com fenilefrina.

Ligantes como a fenilefrina, angiotensina II e noradrenalina estimulam receptores de membrana acoplados à proteína G_q e G_{α12/13}, a qual estimula a atividade da fosfolipase C (FUKATA *et al.*, 2001). Esta enzima promove a formação de dois segundos mensageiros, o IP₃ e o DAG. A ligação do IP₃ ao seu receptor no

retículo sarcoplasmático resulta em liberação de cálcio para o citosol. Além disso, o cálcio junto com DAG ativa a proteína cinase C (PKC), que fosforila proteínas específicas (KARAKI, 2004; KARAKI *et al.*, 1997; MCFADZEAN; GIBSON, 2002). O estado de fosforilação da MLC é regulado pela fosfatase da MLC (MLCP) e pela MLCK (FUKATA *et al.*, 2001; RIDLEY, 1996; SOMLYO *et al.*, 1999). A MLCP defosforila a MLC, inibindo a contração. A inibição da atividade da MLCP permite que a MLC continue fosforilada mantendo a contração. As proteínas G de baixo peso molecular RhoA e seu alvo Rho-cinase (ROCK) possuem papel importante na regulação da atividade da MLCP (SEASHOLTZ *et al.*, 1999). A ROCK fosforila a subunidade da MLCP (especificamente a subunidade 1 da miosina fosfatase, MYPT-1), inibindo sua atividade, assim mantendo o estado de fosforilação da MLC (CHITALEY *et al.*, 2001; UEHATA *et al.*, 1997). Além disso, a AII pode ativar a RhoA que em seu estado inativado liga-se ao GDP. A AII quando liga-se ao receptor AT1 acoplado a uma proteína $G_{12/13}$, ativa o fator de troca (GEF), que facilita a troca do GDP por GTP. A RhoA ligada ao GTP migra para a membrana plasmática e ativa a ROCK, que fosforila a MYPT-1, aumentando a sensibilização ao Ca^{2+} . Alterações na atividade da via RhoA/ROCK podem contribuir para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como a hipertensão (WIRTH, 2010). Considerando-se que esta via RhoA/ROCK está mais ativa em modelos de hipertensão, avaliamos o efeito de inibidores desta via. O inibidor farmacológico da ROCK Y-27632, bloqueia sua atividade por competir com o ATP em seu sítio de ligação na ROCK. Na concentração usada em nosso estudo, o mesmo não modificou a resposta contrátil induzida pela fenilefrina no grupo Frutose 6%, porém reduziu significativamente a resposta no grupo controle. Provavelmente esse efeito demonstra uma menor atividade desta via em ratos Frutose 6%, sendo necessárias concentrações maiores para inibir a contração no grupo Frutose 6%. Porém, vale ressaltar que a contratilidade da aorta neste grupo é menor que no grupo controle e esses experimentos foram feitos em aorta com endotélio funcional. O relaxamento obtido com a adição do composto Y-27632 mostrou-se ser mais potente no grupo Frutose 6%, na presença de endotélio. A avaliação da atividade da via RhoA/ROCK em aorta de rato Frutose 6% não mostrou alteração na expressão e/ou atividade da RhoA. Entretanto, a expressão e/ou atividade da ROCK I mostrou-se reduzida na aorta do grupo Frutose 6%. Esses resultados sugerem que há uma menor ativação da via

RhoA/ROCK, o que pode contribuir para a hipo-reatividade observada nas preparações de aorta do grupo Frutose 6%.

Um mecanismo importante na limitação do influxo de cálcio para o meio intracelular é a ativação de canais de potássio por meio de hiperpolarização da membrana das células do músculo liso vascular, favorecendo o relaxamento (NELSON; QUAYLE, 1995). Por isso investigamos se a hipo-reatividade encontrada em aorta de ratos Frutose 6% poderia envolver a ativação de canais de K^+ . Observamos que tanto o TEA, bloqueador inespecífico de canais de K^+ , como a 4-AP, um bloqueador seletivo de canais K_v , modificaram a hipo-reatividade encontrada na aorta do grupo Frutose 6%. A resposta contrátil induzida pela fenilefrina na presença destes bloqueadores foi semelhante à resposta encontrada no grupo controle, no qual a presença do TEA ou da 4-AP não modificou a resposta contrátil para a fenilefrina. A glibenclamida, um bloqueador de canais K_{ATP} , e a IbTx, um bloqueador de canais BK_{Ca} , não modificaram a resposta máxima, porém potencializaram o efeito contrátil induzido pela fenilefrina em aorta de ratos expostos à dieta Frutose 6%. Nossos resultados sugerem que a hipo-reatividade encontrada em aorta do grupo Frutose 6% parece envolver a ativação dos canais de K^+ , principalmente dos K_v . Canais de potássio podem ser ativados por mediadores como o NO, bem como por EROs e a ERNs. Por exemplo, o $ONOO^-$ ativa os canais de potássio na membrana do músculo liso vascular levando à vasodilatação (ARCHER *et al.*, 1994; BRAYDEN *et al.*, 1991; ONOUE; KATUSIC, 1997). Li e colaboradores mostraram que em aorta isolada o relaxamento induzido pelo $ONOO^-$ foi inibido na presença do TEA, mas não pela glibenclamida (LI, J. *et al.*, 2005), indicando que os canais de K^+ podem ser ativados por ERNs.

É descrito na literatura que em modelo animal de hipertensão arterial, assim como em humanos hipertensos existe uma forte relação entre o estresse oxidativo vascular e a hipertensão que envolve a formação de O_2^- (MUNZEL *et al.*, 2005; PARAVICINI; TOUYZ, 2008). O tecido cardíaco e o vascular são fontes de EROs, incluindo o O_2^- , H_2O_2 e NO^\cdot . Todos os tipos de células nas paredes dos vasos produzem e são reguladas por EROs (GRIENDLING *et al.*, 2000; SUZUKI, Y. J.; FORD, 1999).

Em condições fisiológicas a dismutação do O_2^- pela enzima SOD ocorre de maneira em que a concentração de NO e sua biodisponibilidade sejam mantidas. Entretanto, alterações na velocidade da reação entre NO e O_2^- ou na produção de

NO, pode favorecer a formação do ONOO^- , redução na expressão da NOS, ou a falta de cofatores para a NOS-III (CRIMI *et al.*, 2007).

Por isso, passamos a avaliar se as EROs poderiam contribuir de alguma maneira para a hipo-reatividade observada em aortas do grupo Frutose 6%. Na presença de um inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase (apocinina) observamos que a resposta contrátil induzida pela fenilefrina foi restaurada no grupo tratado com Frutose 6%, mas não no grupo controle, sugerindo uma possível participação desta enzima e de seu produto na modulação da resposta vascular à fenilefrina na aorta do grupo tratado com Frutose 6%, uma vez que o sequestro do O_2^- restabeleceu a contração induzida pela fenilefrina nesses vasos.

A enzima SOD é responsável pela catálise de O_2^- a H_2O_2 . A adição da SOD não alterou a resposta contrátil induzida pela fenilefrina no grupo Frutose 6% ou no grupo controle. A SOD é uma metaloenzima que catalisa a dismutação do O_2^- protegendo as células do dano oxidativo, mas que possui meia vida curta e praticamente não permeia as membranas celulares (RILEY, 2000). Em razão dessas características, pequenas moléculas capazes de mimetizar a atividade da SOD têm sido desenvolvidas (AFONSO *et al.*, 2007; SAFAVI *et al.*, 2010). O tempol, uma dessas moléculas, é um mimético da atividade da SOD que permeia a membrana celular (AUGUSTO *et al.*, 2008; SAMAI *et al.*, 2007). Nossos resultados mostraram que o tempol modificou a resposta máxima contrátil induzida pela fenilefrina no grupo Frutose 6%, e como a apocinina, não alterou a resposta contrátil no grupo controle. Nossos resultados indicam que nestas condições o tempol, por dismutar o O_2^- , contribuiu para a restauração da resposta contrátil induzida pela fenilefrina. Com base em nossos resultados é possível pressupor que a dieta com Frutose 6% contribua para o distúrbio no sistema redox e que o O_2^- formado em excesso contribua para a hipo-contratilidade à fenilefrina em vasos de animais expostos à Frutose 6%. O O_2^- é dismutado pela SOD formando H_2O_2 , que ao contrário do O_2^- não possui carga e é relativamente estável. Por essa razão o H_2O_2 difunde-se facilmente para dentro das células (TOUYZ; BRIONES, 2011). O aumento na produção de H_2O_2 leva a alterações na síntese de ATP, desregula o Ca^{2+} celular além de predispor à morte celular (DELANO *et al.*, 2006). A enzima catalase promove a degradação de H_2O_2 em água e oxigênio. Ao longo do estudo hipotetizamos que a atividade da catalase poderia estar reduzida na aorta do grupo Frutose 6%. Porém a remoção de H_2O_2 pela Peg-catalase (a catalase conjugada

permeia a membrana celular além de aumentar sua meia vida (BECKMAN *et al.*, 1988)) não foi capaz de modificar a resposta contrátil para fenilefrina no grupo Frutose 6% e nem no grupo controle. O que significa que provavelmente os níveis de H_2O_2 não estão aumentados em aorta de ratos com tratamento de Frutose 6%.

Esse conjunto de dados obtidos em aorta de rato expostos à Frutose 6% nos sugere um desequilíbrio na produção das EROs, uma vez que o inibidor da NADPH oxidase e o sequestrador de $O_2^{\cdot-}$ conseguiram reverter a hipo-reatividade encontrada em aorta de ratos Frutose 6%. Em situações de aumento na produção de EROs os organismos vivos possuem as defesas antioxidantes, que são substâncias presentes em baixas concentrações em relação a um substrato oxidável, retardando ou impedindo a oxidação do substrato. As defesas antioxidantes compreendem ações enzimáticas e não enzimáticas. As principais enzimas antioxidantes vasculares são a SOD, a catalase e a glutathione peroxidase (GONGORA *et al.*, 2006; SINDHU *et al.*, 2005).

A SOD é produzida e secretada pelas células do músculo liso vascular e liga-se a glicosaminoglicanos na matriz extracelular vascular na superfície das células endoteliais (WASSMANN *et al.*, 2004), é a principal enzima envolvida na eliminação do $O_2^{\cdot-}$ convertendo-o em H_2O_2 . A glutathione peroxidase reduz H_2O_2 e peróxidos lipídicos em água e em seus alcoois equivalentes, esses produtos são altamente citotóxicos, e por sua vez oxidam a glutathione em glutathione dissulfeto. O sistema glutathione é importante quando os níveis de estresse oxidativo são baixos. Em nosso estudo tanto os níveis da SOD como os da glutathione estão reduzidos em aorta do grupo Frutose 6%. A catalase é um antioxidante intracelular, que catalisa a reação do H_2O_2 em água e oxigênio molecular, sendo efetiva em níveis elevados de estresse oxidativo, protegendo as células do H_2O_2 . A catalase é importante em casos onde os níveis de glutathione estão limitados ou a atividade da glutathione peroxidase está reduzida (CAI, 2005). Em nosso estudo não observamos alterações nos níveis da catalase. O que indica que o aumento na produção de EROs observada na aorta do grupo tratado com Frutose 6% provavelmente não é proveniente do H_2O_2 , uma vez que a adição da catalase não modificou a contração induzida pela fenilefrina e os níveis da enzima CAT não estão alterados.

Existem evidências que demonstram que o estresse oxidativo está presente em humanos hipertensos (FORTUNO *et al.*, 2004), essas evidências são baseadas em níveis plasmáticos elevados de biomarcadores do estresse oxidativo como, por

exemplo, a peroxidação lipídica (WARD *et al.*, 2004). A oxidação de componentes celulares como proteínas, lipídeos e ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas pelas EROs inicia um processo conhecido com peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LOOH) (GILLE; SIGLER, 1995). Este processo leva à destruição das membranas celulares, comprometendo sua estrutura e as trocas metabólicas podendo levar à morte celular (BENZIE, 1996). A peroxidação lipídica ocorre quando um oxigênio molecular se incorpora a um ácido graxo poliinsaturado para produzir um LOOH, essa reação pode ser desencadeada via COX ou ter a participação das EROs ou ERNs (AL-MEHDI *et al.*, 1993; PORTER *et al.*, 1995). Além disso, a decomposição do ONOO^- forma radical hidroxila e radical dióxido de nitrogênio, ambos participam do processo de peroxidação lipídica (BARTESAGHI *et al.*, 2006; RADL *et al.*, 1991). Em nosso estudo observamos níveis elevados de LOOH em aorta de rato Frutose 6%, todo este processo culmina com alterações celulares estruturais. Esse resultado nos indica que o tratamento com a Frutose 6% pode ser responsável por alterações funcionais da aorta, uma vez que peroxidação lipídica é responsável por danos na estrutura das celulares. Além disso, a decomposição do ONOO^- gera a formação de nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) e ambos reagem com lipídeos levando à peroxidação lipídica (CARBALLAL *et al.*, 2003; QUIJANO *et al.*, 1997), o que nos permite sugerir que em aorta de rato exposto à Frutose 6%, pode haver aumento da peroxidação lipídica, pois os níveis de LOOH se encontraram elevados.

Tendo em vista os efeitos dos agentes sequestradores de O_2^- na resposta contrátil da aorta podemos sugerir que exista um aumento nos níveis de EROs produzidos pelo complexo enzimático NADPH oxidase, e que a principal espécie reativa envolvida possa ser o ONOO^- , uma vez que o agente sequestrador de O_2^- o tempol, produziu efeito sobre a hipo-reatividade da aorta e os níveis da enzima catalase não estão modificados. O O_2^- que pode ser produzido em excesso é liberado e não é totalmente dismutado pela SOD, uma vez que os níveis desta enzima estão reduzidos em aorta de ratos Frutose 6%. Nessas condições o O_2^- complexa com o NO e forma o ONOO^- , que mesmo possuindo uma vida relativamente curta, possui habilidade em permear as membranas, e isso implica que depois de formado o ONOO^- pode influenciar as células que estão ao seu redor (DENICOLA *et al.*, 1998; MARLA *et al.*, 1997). Além disso, o relaxamento observado em aorta de rato pode ser pela ação do ONOO^- via ativação de canais de

K⁺ cujo efeito foi bloqueado pelo TEA, um bloqueador não específico de canais de K⁺ (LI, J. *et al.*, 2005). O mesmo efeito pode ser evidenciado em nossos experimentos, onde o bloqueio dos canais de K⁺ com o TEA e o 4-AP restauraram a contração induzida pela fenilefrina em aorta do grupo Frutose 6%. Além de participar da ativação de canais de K⁺, o ONOO⁻ em pequenas concentrações, pode estimular a atividade da SERCA aumentando a recaptção de Ca²⁺ para o retículo sarcoplasmático, e ativar diretamente a MLCP reduzindo a resposta contrátil (LI, J. *et al.*, 2005). Apesar de não termos observado alterações nos níveis da SERCA, uma investigação mais aprofundada deverá ser feita, uma vez que esse efeito pode ser mediado também pela GSH, que se liga à SERCA ativando-a (COHEN; ADACHI, 2006). Foi demonstrado também que o ONOO⁻ desencadeia relaxamento por aumentar os níveis intracelulares de GMPc, uma vez que na presença do ODQ o relaxamento é anulado e por ativar a fosfatase da cadeia leve da miosina, produzindo relaxamento (LI, J. *et al.*, 2005). O ONOO⁻ também promove a oxidação do BH₄ que é um cofator essencial para a funcionalidade da NOS. Baixos níveis de BH₄ podem gerar um ciclo de sua própria destruição, que é mediado pela formação de peroxinitrito pela própria NOS levando ao desacoplamento da NOS, mecanismo responsável por contribuir para disfunção endotelial, induzido pelo estresse oxidativo (FORSTERMANN; MUNZEL, 2006; KUZKAYA *et al.*, 2003; MILSTIEN; KATUSIC, 1999).

Nosso conjunto de resultados mostram que a associação de quantidades moderadas de NaCl 4% e Frutose 6% à dieta por um período de 6 semanas promoveu elevação da pressão arterial, assim como mudança na pressão vascular renal, e que o consumo de Frutose 6% por si só já é o suficiente para elevar a pressão arterial e a frequência cardíaca e promover alterações funcionais vasculares importantes. É necessário mais estudos para relacionar nossas descobertas em modelo animal para os seres humanos, e para estabelecer o quanto o consumo de frutose aumenta os riscos cardiovasculares. Por fim, limitações importantes no presente estudo devem ser consideradas e questões ainda deverão ser avaliadas: 1) seria interessante conduzir o tempo de tratamento por mais tempo; 2) utilizar fêmeas e avaliar a prole; 3) dosagens plasmáticas e teciduais de ERNs; 4) tratar os animais com antioxidantes. Na figura 30, temos uma representação esquemática dos efeitos da dieta acrescida de frutose 6% em aorta de ratos desde o dia do desmame por seis semanas.

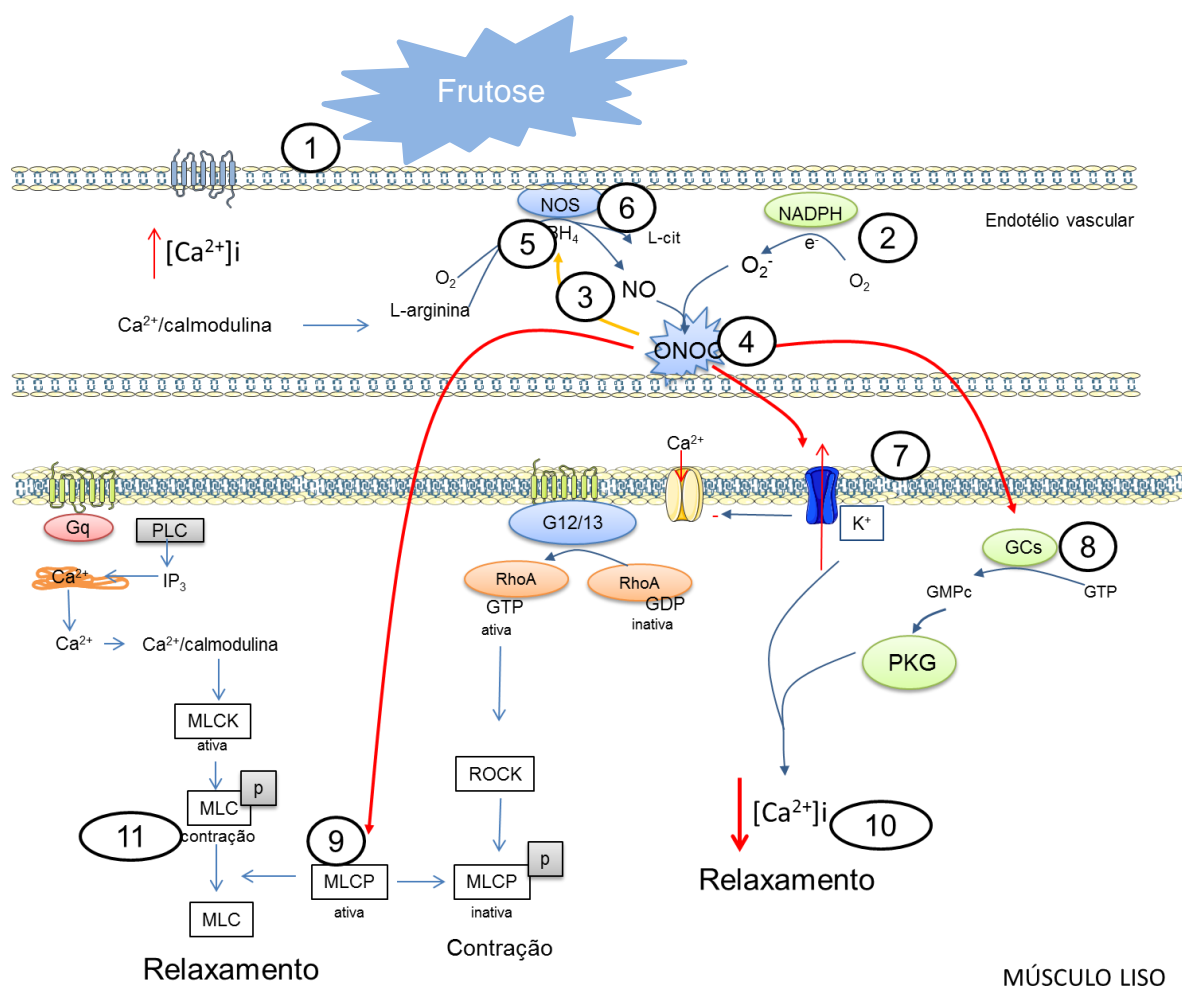


Figura 30. Esquema proposto para as principais contribuições do ONOO^- possivelmente envolvidas na hiporreatividade à fenilefrina em aortas de ratos tratados com dieta Frutose 6%. Em preparações de aortas com endotélio vascular obtidas de ratos expostos à 1) Frutose 6% provavelmente ocorreu aumento na produção de EROs e de ERNs. Um aumento na produção de 2) O_2^- pode resultar na sua ligação com o 3) NO gerando a formação do 4) ONOO^- . O ONOO^- além de oxidar o 5) BH_4 , tornando a 6) NOS-III desacoplada que passa a produzir 2) O_2^- ao invés de 3) NO, também ativa diretamente 7) canais de potássio, 8) GCs e a 9) MLCP. Intensificando os mecanismos 10) vasodilatadores induzidos pelo NO e inibindo o 11) mecanismo contrátil induzido pela fenilefrina.

7. CONCLUSÕES

A análise do conjunto de dados obtidos em nosso estudo com ratos expostos desde o dia do desmame por 6 semanas a dieta acrescida de NaCl 4% ou Frutose 6% ou NaCl 4%/Frutose 6% nos permite concluir que:

- 1) A associação de NaCl 4% e Frutose 6% à dieta de ratos causa aumento na pressão arterial, e reflete na pressão de perfusão vascular renal, na reatividade vascular renal e na reatividade do leito vascular mesentérico;
- 2) A dieta com Frutose 6% afetou a biologia vascular, que foi caracterizada pela hipertensão e por alterações na reatividade vascular;
- 3) Mostramos também que o endotélio vascular modulou negativamente a contração induzida pela ação da fenilefrina em aorta de rato exposto à Frutose 6%;
- 4) Sendo a hipo-reatividade regulada por ativação da via NO/GCs;
- 5) A hipo-reatividade vascular em anéis de aorta do grupo tratado com Frutose 6% parece ser pelo menos em parte, devido a uma maior produção de NO que reage com o ânion superóxido formando ONOO⁻.

Como conclusão final, respondendo à nossa hipótese inicial a dieta ocidentalizada com níveis de sódio e frutose acima do recomendado mostrou-se capaz de promover alterações na pressão arterial e nos vasos contribuindo para aumentar os riscos cardiovasculares.

8. REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-6, 1984.

AFONSO, V. et al. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. **Joint Bone Spine**, v. 74, n. 4, p. 324-9, Jul 2007.

AICHER, A. et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. **Nat Med**, v. 9, n. 11, p. 1370-6, Nov 2003.

AKAIKE, T. et al. Antagonistic action of imidazolineoxyl N-oxides against endothelium-derived relaxing factor/.NO through a radical reaction. **Biochemistry**, v. 32, n. 3, p. 827-32, Jan 26 1993.

AL-MEHDI, A. B. et al. A phospholipase A2 inhibitor decreases generation of thiobarbituric acid reactive substance during lung ischemia-reperfusion. **Biochim Biophys Acta**, v. 1167, n. 1, p. 56-62, Mar 17 1993.

ALBINA, J. E.; ABATE, J. A.; HENRY, W. L., JR. Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. Role of IFN-gamma in the induction of the nitric oxide-synthesizing pathway. **J Immunol**, v. 147, n. 1, p. 144-8, Jul 1 1991.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J**, v. 357, n. Pt 3, p. 593-615, Aug 1 2001.

ALIOUA, A. et al. The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. **J Biol Chem**, v. 273, n. 49, p. 32950-6, Dec 4 1998.

ALLEN, A. M.; ZHUO, J.; MENDELSON, F. A. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. **Am J Hypertens**, v. 13, n. 1 Pt 2, p. 31s-38s, Jan 2000.

ALTURA, B. T.; ALTURA, B. M. Withdrawal of magnesium causes vasospasm while elevated magnesium produces relaxation of tone in cerebral arteries. **Neurosci Lett**, v. 20, n. 3, p. 323-7, Dec 1980.

ANDO, J.; YAMAMOTO, K. Effects of shear stress and stretch on endothelial function. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 5, p. 1389-403, Sep 1 2011.

ARCHER, S. L. et al. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 16, p. 7583-7, Aug 2 1994.

ARSENIJEVIC, Y.; BAERTSCHI, A. J. Activation of the hypothalamo-neurohypophyseal system by hypertonic superfusion of the rat mesentery. **Brain Res**, v. 347, n. 1, p. 169-72, Nov 11 1985.

ASAHARA, T. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**, v. 275, n. 5302, p. 964-7, Feb 14 1997.

AUGUSTO, O. et al. Cyclic nitroxides inhibit the toxicity of nitric oxide-derived oxidants: mechanisms and implications. **An Acad Bras Cienc**, v. 80, n. 1, p. 179-89, Mar 2008.

BACHETTI, T. et al. Co-expression and modulation of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells. **J Mol Cell Cardiol**, v. 37, n. 5, p. 939-45, Nov 2004.

BACHMANN, S.; BOSSE, H. M.; MUNDEL, P. Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. **Am J Physiol**, v. 268, n. 5 Pt 2, p. F885-98, May 1995.

BANKIR, L. Antidiuretic action of vasopressin: quantitative aspects and interaction between V1a and V2 receptor-mediated effects. **Cardiovasc Res**, v. 51, n. 3, p. 372-90, Aug 15 2001.

BARTESAGHI, S. et al. Mechanistic studies of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration in membranes using the hydrophobic probe N-t-BOC-L-tyrosine tert-butyl ester. **Biochemistry**, v. 45, n. 22, p. 6813-25, Jun 6 2006.

BASCIANO, H.; FEDERICO, L.; ADELI, K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. **Nutr Metab (Lond)**, v. 2, n. 1, p. 5, Feb 21 2005.

BAUER, V.; SOTNIKOVA, R. Nitric oxide--the endothelium-derived relaxing factor and its role in endothelial functions. **Gen Physiol Biophys**, v. 29, n. 4, p. 319-40, Dec 2010.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am J Physiol**, v. 271, n. 5 Pt 1, p. C1424-37, Nov 1996.

BECKMAN, J. S. et al. Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. **J Biol Chem**, v. 263, n. 14, p. 6884-92, May 15 1988.

BENJAMIN, N.; DUTTON, J. A.; RITTER, J. M. Human vascular smooth muscle cells inhibit platelet aggregation when incubated with glyceryl trinitrate: evidence for generation of nitric oxide. **Br J Pharmacol**, v. 102, n. 4, p. 847-50, Apr 1991.

BENZIE, I. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. **Int J Food Sci Nutr**, v. 47, n. 3, p. 233-61, May 1996.

BERGHEIM, I. et al. Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin. **J Hepatol**, v. 48, n. 6, p. 983-92, Jun 2008.

BLANKENHORN, D. H.; KRAMSCH, D. M. Reversal of atherosclerosis and sclerosis. The two components of atherosclerosis. **Circulation**, v. 79, n. 1, p. 1-7, Jan 1989.

BOHM, M. Angiotensin receptor blockers versus angiotensin-converting enzyme inhibitors: where do we stand now? **Am J Cardiol**, v. 100, n. 3a, p. 38j-44j, Aug 6 2007.

BOLOTINA, V. M. et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, n. 6474, p. 850-3, Apr 28 1994.

BOLTON, T. B. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. **Physiol Rev**, v. 59, n. 3, p. 606-718, Jul 1979.

BOO, Y. C. et al. Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. **J Biol Chem**, v. 277, n. 5, p. 3388-96, Feb 1 2002.

BOULANGER, C. M. et al. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. **Circ Res**, v. 83, n. 12, p. 1271-8, Dec 14-28 1998.

BRAY, G. A.; NIELSEN, S. J.; POPKIN, B. M. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. **Am J Clin Nutr**, v. 79, n. 4, p. 537-43, Apr 2004.

BRAYDEN, J. E. et al. Role of potassium channels in the vascular response to endogenous and pharmacological vasodilators. **Blood Vessels**, v. 28, n. 1-3, p. 147-53, 1991.

BROWN, A. J. et al. Comparison of fast and slow pressor effects of angiotensin II in the conscious rat. **Am J Physiol**, v. 241, n. 3, p. H381-8, Sep 1981.

BROWN, I. J. et al. Salt intakes around the world: implications for public health. **Int J Epidemiol**, v. 38, n. 3, p. 791-813, Jun 2009.

BURNETT, A. L. et al. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. **Science**, v. 257, n. 5068, p. 401-3, Jul 17 1992.

BUSSE, R. et al. EDHF: bringing the concepts together. **Trends Pharmacol Sci**, v. 23, n. 8, p. 374-80, Aug 2002.

CABRAL, P. D. et al. Fructose stimulates Na/H exchange activity and sensitizes the proximal tubule to angiotensin II. **Hypertension**, v. 63, n. 3, p. e68-73, Mar 2014.

CAI, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. **Cardiovasc Res**, v. 68, n. 1, p. 26-36, Oct 1 2005.

CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circ Res**, v. 87, n. 10, p. 840-4, Nov 10 2000.

CARAFOLI, E. Intracellular calcium homeostasis. **Annu Rev Biochem**, v. 56, p. 395-433, 1987.

CARBALLAL, S. et al. Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite. **Biochemistry**, v. 42, n. 33, p. 9906-14, Aug 26 2003.

CARRETERO, O. A.; OPARIL, S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. **Circulation**, v. 101, n. 3, p. 329-35, Jan 25 2000.

CAULIN-GLASER, T. et al. 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca²⁺ mobilization. **Circ Res**, v. 81, n. 5, p. 885-92, Nov 1997.

CERIELLO, A. et al. Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. **Diabetes**, v. 51, n. 4, p. 1076-82, Apr 2002.

CHALUPSKY, K.; CAI, H. Endothelial dihydrofolate reductase: critical for nitric oxide bioavailability and role in angiotensin II uncoupling of endothelial nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 25, p. 9056-61, Jun 21 2005.

CHEESEMAN, C. I. GLUT2 is the transporter for fructose across the rat intestinal basolateral membrane. **Gastroenterology**, v. 105, n. 4, p. 1050-6, Oct 1993.

CHEN, G.; SUZUKI, H. Some electrical properties of the endothelium-dependent hyperpolarization recorded from rat arterial smooth muscle cells. **J Physiol**, v. 410, p. 91-106, Mar 1989.

CHEN HI, H.; CHIANG, I. P.; JEN, C. J. Exercise Training Increases Acetylcholine-Stimulated Endothelium-Derived Nitric Oxide Release in Spontaneously Hypertensive Rats. **J Biomed Sci**, v. 3, n. 6, p. 454-460, Nov-Dec 1996.

CHEN, Z. et al. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. **J Clin Invest**, v. 103, n. 3, p. 401-6, Feb 1999.

CHENG, X. et al. Selective versus non-selective suppression of nitric oxide synthase on regional hemodynamics in rats with or without LPS-induced endotoxemia. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 367, n. 4, p. 372-9, Apr 2003.

CHITALEY, K.; WEBER, D.; WEBB, R. C. RhoA/Rho-kinase, vascular changes, and hypertension. **Curr Hypertens Rep**, v. 3, n. 2, p. 139-44, Apr 2001.

CHOBANIAN, A. V. et al. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1206-52, Dec 2003.

CIRILLO, P. et al. Ketohexokinase-dependent metabolism of fructose induces proinflammatory mediators in proximal tubular cells. **J Am Soc Nephrol**, v. 20, n. 3, p. 545-53, Mar 2009.

CNUBBEN, N. H. et al. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 10, n. 4, p. 141-52, Sep 2001.

COFFMAN, T. M. Under pressure: the search for the essential mechanisms of hypertension. **Nat Med**, v. 17, n. 11, p. 1402-9, 2011.

_____. The inextricable role of the kidney in hypertension. **J Clin Invest**, v. 124, n. 6, p. 2341-7, Jun 2014.

COHEN, R. A.; ADACHI, T. Nitric-oxide-induced vasodilatation: regulation by physiologic s-glutathiolation and pathologic oxidation of the sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase. **Trends Cardiovasc Med**, v. 16, n. 4, p. 109-14, May 2006.

COHEN, R. A.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. **Circulation**, v. 92, n. 11, p. 3337-49, Dec 1 1995.

CORSON, M. A. et al. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. **Circ Res**, v. 79, n. 5, p. 984-91, Nov 1996.

CRANE, B. R. et al. Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. **Science**, v. 279, n. 5359, p. 2121-6, Mar 27 1998.

CRAVEN, P. A.; DERUBERTIS, F. R. Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and hemeproteins. Evidence for involvement of the paramagnetic nitrosyl-heme complex in enzyme activation. **J Biol Chem**, v. 253, n. 23, p. 8433-43, Dec 10 1978.

CRIBBS, L. L. Vascular smooth muscle calcium channels: could "T" be a target? **Circ Res**, v. 89, n. 7, p. 560-2, Sep 28 2001.

CRIMI, E.; IGNARRO, L. J.; NAPOLI, C. Microcirculation and oxidative stress. **Free Radic Res**, v. 41, n. 12, p. 1364-75, Dec 2007.

DANSER, A. H. et al. Bradykinin-induced release of nitric oxide by the isolated perfused rat heart: importance of preformed pools of nitric oxide-containing factors. **J Hypertens**, v. 16, n. 2, p. 239-44, Feb 1998.

DAVISSON, R. L. et al. Use-dependent loss of acetylcholine- and bradykinin-mediated vasodilation after nitric oxide synthase inhibition. Evidence for preformed stores of nitric oxide-containing factors in vascular endothelial cells. **Hypertension**, v. 28, n. 3, p. 354-60, Sep 1996.

DE SOUZA, P. et al. Hypotensive mechanism of the extracts and artemetin isolated from *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in rats. **Phytomedicine**, v. 18, n. 10, p. 819-25, Jul 15 2011.

DELANO, F. A. et al. Microvascular display of xanthine oxidase and NADPH oxidase in the spontaneously hypertensive rat. **Microcirculation**, v. 13, n. 7, p. 551-66, Oct-Nov 2006.

DELLSPERGER, K. C.; MARCUS, M. L. Effects of left ventricular hypertrophy on the coronary circulation. **Am J Cardiol**, v. 65, n. 22, p. 1504-10, Jun 15 1990.

DENICOLA, A.; SOUZA, J. M.; RADI, R. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 7, p. 3566-71, Mar 31 1998.

DENNINGER, J. W.; MARLETTA, M. A. Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. **Biochim Biophys Acta**, v. 1411, n. 2-3, p. 334-50, May 5 1999.

DIBONA, G. F.; KOPP, U. C. Neural control of renal function. **Physiol Rev**, v. 77, n. 1, p. 75-197, Jan 1997.

DICKINSON, C. J.; LAWRENCE, J. R. A slowly developing pressor response to small concentrations of angiotensin. Its bearing on the pathogenesis of chronic renal hypertension. **Lancet**, v. 1, n. 7295, p. 1354-6, Jun 22 1963.

DIGGLE, C. P. et al. Ketohexokinase: expression and localization of the principal fructose-metabolizing enzyme. **J Histochem Cytochem**, v. 57, n. 8, p. 763-74, Aug 2009.

DIMMELER, S. et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. **Nature**, v. 399, n. 6736, p. 601-5, Jun 10 1999.

DOS SANTOS, L. et al. Effects of high sodium intake diet on the vascular reactivity to phenylephrine on rat isolated caudal and renal vascular beds: Endothelial modulation. **Life Sci**, v. 78, n. 19, p. 2272-9, Apr 4 2006.

DOUARD, V.; FERRARIS, R. P. The role of fructose transporters in diseases linked to excessive fructose intake. **J Physiol**, v. 591, n. Pt 2, p. 401-14, Jan 15 2013.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v. 82, n. 1, p. 47-95, Jan 2002.

ELLIOTT, P. et al. Change in salt intake affects blood pressure of chimpanzees: implications for human populations. **Circulation**, v. 116, n. 14, p. 1563-8, Oct 2 2007.

FARACI, F. M.; HEISTAD, D. D. Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. **Physiol Rev**, v. 78, n. 1, p. 53-97, Jan 1998.

FARQUHAR, W. B. et al. Dietary sodium and health: more than just blood pressure. **J Am Coll Cardiol**, v. 65, n. 10, p. 1042-50, Mar 17 2015.

FELETOU, M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? **Br J Pharmacol**, v. 156, n. 4, p. 545-62, Feb 2009.

FELETOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **Br J Pharmacol**, v. 93, n. 3, p. 515-24, Mar 1988.

FERRIS, C. D.; SNYDER, S. H. IP3 receptors. Ligand-activated calcium channels in multiple forms. **Adv Second Messenger Phosphoprotein Res**, v. 26, p. 95-107, 1992.

FIELDS, L. E. et al. The burden of adult hypertension in the United States 1999 to 2000: a rising tide. **Hypertension**, v. 44, n. 4, p. 398-404, Oct 2004.

FINKEL, T. Oxidant signals and oxidative stress. **Curr Opin Cell Biol**, v. 15, n. 2, p. 247-54, Apr 2003.

FISH, J. E.; MARSDEN, P. A. Endothelial nitric oxide synthase: insight into cell-specific gene regulation in the vascular endothelium. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, n. 2, p. 144-62, Jan 2006.

FLEMING, I.; BUSSE, R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 284, n. 1, p. R1-12, Jan 2003.

FOLKOW, B. et al. Importance of adaptive changes in vascular design for establishment of primary hypertension, studied in man and in spontaneously hypertensive rats. **Circ Res**, v. 32, p. Suppl 1:2-16, May 5 1973.

FORSTERMANN, U. et al. Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. **Circ Res**, v. 58, n. 4, p. 531-8, Apr 1986.

FORSTERMANN, U.; MUNZEL, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. **Circulation**, v. 113, n. 13, p. 1708-14, Apr 4 2006.

FORTUNO, A. et al. Association of increased phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production with diminished nitric oxide generation in essential hypertension. **J Hypertens**, v. 22, n. 11, p. 2169-75, Nov 2004.

FRANCIS, S. H. et al. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. **Pharmacol Rev**, v. 62, n. 3, p. 525-63, Sep 2010.

FUKAI, T. et al. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. **J Clin Invest**, v. 105, n. 11, p. 1631-9, Jun 2000.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 6, p. 1583-606, Sep 15 2011.

FUKATA, Y.; AMANO, M.; KAIBUCHI, K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. **Trends Pharmacol Sci**, v. 22, n. 1, p. 32-9, Jan 2001.

FULTON, D. et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. **Nature**, v. 399, n. 6736, p. 597-601, Jun 10 1999.

FURCHGOTT, R. F. Introduction to EDRF research. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 22 Suppl 7, p. S1-2, 1993.

FURCHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **Faseb j**, v. 3, n. 9, p. 2007-18, Jul 1989.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-6, Nov 27 1980.

FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. **J Intern Med**, v. 264, n. 3, p. 224-36, Sep 2008.

GABELLA, G. Caveolae intracellulares and sarcoplasmic reticulum in smooth muscle. **J Cell Sci**, v. 8, n. 3, p. 601-9, May 1971.

_____. Structural apparatus for force transmission in smooth muscles. **Physiol Rev**, v. 64, n. 2, p. 455-77, Apr 1984.

GARCIA, C. et al. Effects of adrenaline on glucose and glutamine metabolism and superoxide production by rat neutrophils. **Clin Sci (Lond)**, v. 96, n. 6, p. 549-55, Jun 1999.

GARLAND, C. J.; MCPHERSON, G. A. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery. **Br J Pharmacol**, v. 105, n. 2, p. 429-35, Feb 1992.

GARVEY, E. P. et al. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. **J Biol Chem**, v. 272, n. 8, p. 4959-63, Feb 21 1997.

GILLE, G.; SIGLER, K. Oxidative stress and living cells. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 40, n. 2, p. 131-52, 1995.

GONGORA, M. C. et al. Role of extracellular superoxide dismutase in hypertension. **Hypertension**, v. 48, n. 3, p. 473-81, Sep 2006.

GRAUDAL, N. A.; GALLOE, A. M.; GARRED, P. Effects of sodium restriction on blood pressure, renin, aldosterone, catecholamines, cholesterol, and triglyceride: a meta-analysis. **Jama**, v. 279, n. 17, p. 1383-91, May 6 1998.

GREGG, D.; RAUSCHER, F. M.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P. J. Rac regulates cardiovascular superoxide through diverse molecular interactions: more than a binary GTP switch. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 285, n. 4, p. C723-34, Oct 2003.

GRIENDLING, K. K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circ Res**, v. 86, n. 5, p. 494-501, Mar 17 2000.

GROSS, S. S. et al. Cytokine-activated endothelial cells express an isotype of nitric oxide synthase which is tetrahydrobiopterin-dependent, calmodulin-independent and inhibited by arginine analogs with a rank-order of potency characteristic of activated macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 178, n. 3, p. 823-9, Aug 15 1991.

GROSS, S. S.; WOLIN, M. S. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. **Annu Rev Physiol**, v. 57, p. 737-69, 1995.

GROSSMAN, A.; MESSERLI, F. H.; GROSSMAN, E. Drug induced hypertension - An unappreciated cause of secondary hypertension. **Eur J Pharmacol**, v. 763, n. Pt A, p. 15-22, Sep 15 2015.

GSCHWANDTNER, M. E. et al. [Diagnosis and therapy of Cushing syndrome]. **Wien Klin Wochenschr**, v. 109, n. 2, p. 47-52, Jan 31 1997.

GUNNETT, C. A. et al. Mechanisms of inducible nitric oxide synthase-mediated vascular dysfunction. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, n. 8, p. 1617-22, Aug 2005.

GUTMAN, G. A. et al. International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. **Pharmacol Rev**, v. 55, n. 4, p. 583-6, Dec 2003.

GUYTON, A. C. Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. **Science**, v. 252, n. 5014, p. 1813-6, Jun 28 1991.

HABIG, W. H. et al. The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 71, n. 10, p. 3879-82, Oct 1974.

HACKAM, D. G. et al. The 2010 Canadian Hypertension Education Program recommendations for the management of hypertension: part 2 - therapy. **Can J Cardiol**, v. 26, n. 5, p. 249-58, May 2010.

HARLOS, J.; HEIDLAND, A. Hypertension as cause and consequence of renal disease in the 19th century. **Am J Nephrol**, v. 14, n. 4-6, p. 436-42, 1994.

HARRISON, D. G. Endothelial function and oxidant stress. **Clin Cardiol**, v. 20, n. 11 Suppl 2, p. li-11-7, Nov 1997.

HAURANI, M. J.; PAGANO, P. J. Adventitial fibroblast reactive oxygen species as autocrine and paracrine mediators of remodeling: bellwether for vascular disease? **Cardiovasc Res**, v. 75, n. 4, p. 679-89, Sep 1 2007.

HAVEL, P. J. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. **Nutr Rev**, v. 63, n. 5, p. 133-57, May 2005.

HE, F. J.; BURNIER, M.; MACGREGOR, G. A. Nutrition in cardiovascular disease: salt in hypertension and heart failure. **Eur Heart J**, v. 32, n. 24, p. 3073-80, Dec 2011.

HEITZER, T. et al. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 43, n. 11, p. 1435-8, Nov 2000.

HELLIWELL, P. A. et al. Stimulation of fructose transport across the intestinal brush-border membrane by PMA is mediated by GLUT2 and dynamically regulated by protein kinase C. **Biochem J**, v. 350 Pt 1, p. 149-54, Aug 15 2000.

HEWITT, S. M.; DEAR, J.; STAR, R. A. Discovery of protein biomarkers for renal diseases. **J Am Soc Nephrol**, v. 15, n. 7, p. 1677-89, Jul 2004.

HIGASHI, Y. et al. Tetrahydrobiopterin enhances forearm vascular response to acetylcholine in both normotensive and hypertensive individuals. **Am J Hypertens**, v. 15, n. 4 Pt 1, p. 326-32, Apr 2002.

HIGUCHI, S. et al. Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. **Clin Sci (Lond)**, v. 112, n. 8, p. 417-28, Apr 2007.

HINGORANI, A. D. et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. **Circulation**, v. 100, n. 14, p. 1515-20, Oct 5 1999.

HOGG, N. et al. Reactions of nitric oxide with nitronyl nitroxides and oxygen: prediction of nitrite and nitrate formation by kinetic simulation. **Free Radic Res**, v. 22, n. 1, p. 47-56, Jan 1995.

HOLLENBERG, N. K. Aldosterone in the development and progression of renal injury. **Kidney Int**, v. 66, n. 1, p. 1-9, Jul 2004.

HONG, H. J. et al. Supplementation with tetrahydrobiopterin suppresses the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 38, n. 5, p. 1044-8, Nov 2001.

HOPKINS, N. K.; GORMAN, R. R. Regulation of endothelial cell cyclic nucleotide metabolism by prostacyclin. **J Clin Invest**, v. 67, n. 2, p. 540-6, Feb 1981.

HOROWITZ, A. et al. Mechanisms of smooth muscle contraction. **Physiol Rev**, v. 76, n. 4, p. 967-1003, Oct 1996.

HUTCHINSON, P. J.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Comparative pharmacology of EDRF and nitric oxide on vascular strips. **Eur J Pharmacol**, v. 141, n. 3, p. 445-51, Sep 23 1987.

HWANG, I. S. et al. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. **Hypertension**, v. 10, n. 5, p. 512-6, Nov 1987.

IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circ Res**, v. 61, n. 6, p. 866-79, Dec 1987.

IGNARRO, L. J. et al. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 237, n. 3, p. 893-900, Jun 1986.

IMIG, J. D.; ROMAN, R. J. Nitric oxide modulates vascular tone in preglomerular arterioles. **Hypertension**, v. 19, n. 6 Pt 2, p. 770-4, Jun 1992.

JACKSON, W. F. Ion channels and vascular tone. **Hypertension**, v. 35, n. 1 Pt 2, p. 173-8, Jan 2000.

JACKSON, W. F. et al. Prostacyclin-induced vasodilation in rabbit heart is mediated by ATP-sensitive potassium channels. **Am J Physiol**, v. 264, n. 1 Pt 2, p. H238-43, Jan 1993.

JACOB, F. et al. Role of renal nerves in development of hypertension in DOCA-salt model in rats: a telemetric approach. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 289, n. 4, p. H1519-29, Oct 2005.

Jl, G. et al. Stretch-induced calcium release in smooth muscle. **J Gen Physiol**, v. 119, n. 6, p. 533-44, Jun 2002.

JIANG, Z. Y.; WOOLLARD, A. C.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylene orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, n. 10, p. 853-6, Oct 1991.

JIN, X. et al. New molecular mechanisms for cardiovascular disease: contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of vasoconstriction in peripheral resistance arteries. **J Pharmacol Sci**, v. 116, n. 4, p. 332-6, 2011.

JOHNSON, R. J. et al. Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? **Endocr Rev**, v. 30, n. 1, p. 96-116, Feb 2009.

JOSEPH, J.; KALYANARAMAN, B.; HYDE, J. S. Trapping of nitric oxide by nitronyl nitroxides: an electron spin resonance investigation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 192, n. 2, p. 926-34, Apr 30 1993.

JUNG, O. et al. Inactivation of extracellular superoxide dismutase contributes to the development of high-volume hypertension. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n. 3, p. 470-7, Mar 2007.

KARAKI, H. Historical techniques: cytosolic Ca²⁺ and contraction in smooth muscle. **Trends Pharmacol Sci**, v. 25, n. 7, p. 388-93, Jul 2004.

KARAKI, H. et al. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacol Rev**, v. 49, n. 2, p. 157-230, Jun 1997.

KASPRZAK, J. D.; KLOSINSKA, M.; DROZDZ, J. Clinical aspects of assessment of endothelial function. **Pharmacol Rep**, v. 58 Suppl, p. 33-40, 2006.

KATSUKI, S. et al. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. **J Cyclic Nucleotide Res**, v. 3, n. 1, p. 23-35, Feb 1977.

KAWASAKI, H. et al. NPY modulates neurotransmission of CGRP-containing vasodilator nerves in rat mesenteric arteries. **Am J Physiol**, v. 261, n. 3 Pt 2, p. H683-90, Sep 1991.

KAWASAKI, H. et al. Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat. **Nature**, v. 335, n. 6186, p. 164-7, Sep 8 1988.

KELLOGG, D. L., JR. et al. Acetylcholine-induced vasodilation is mediated by nitric oxide and prostaglandins in human skin. **J Appl Physiol (1985)**, v. 98, n. 2, p. 629-32, Feb 2005.

KIM, K. M. et al. A sensitive and specific liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of intracellular and extracellular uric acid. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 877, n. 22, p. 2032-8, Jul 15 2009.

KITIYAKARA, C. et al. Salt intake, oxidative stress, and renal expression of NADPH oxidase and superoxide dismutase. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, n. 11, p. 2775-82, Nov 2003.

KLESCHYOV, A. L. et al. Adventitia-derived nitric oxide in rat aortas exposed to endotoxin: cell origin and functional consequences. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 279, n. 6, p. H2743-51, Dec 2000.

KOBZIK, L. et al. Nitric oxide in skeletal muscle. **Nature**, v. 372, n. 6506, p. 546-8, Dec 8 1994.

KOHLER, S. et al. Temporal evolution of cognitive changes in incident hypertension: prospective cohort study across the adult age span. **Hypertension**, v. 63, n. 2, p. 245-51, Feb 2014.

KUBES, P. et al. Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. **Faseb j**, v. 7, n. 13, p. 1293-9, Oct 1993.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 11, p. 4651-5, Jun 1 1991.

KUBO, Y. et al. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. **Pharmacol Rev**, v. 57, n. 4, p. 509-26, Dec 2005.

KUZKAYA, N. et al. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. **J Biol Chem**, v. 278, n. 25, p. 22546-54, Jun 20 2003.

LACOLLEY, P. et al. Nitric oxide synthase gene polymorphisms, blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects. **J Hypertens**, v. 16, n. 1, p. 31-5, Jan 1998.

LANDMESSER, U. et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. **J Clin Invest**, v. 111, n. 8, p. 1201-9, Apr 2003.

LANGTON, P. D. et al. Block of calcium-activated potassium channels in mammalian arterial myocytes by tetraethylammonium ions. **Am J Physiol**, v. 260, n. 3 Pt 2, p. H927-34, Mar 1991.

LANTOINE, F. et al. Nitric oxide production in human endothelial cells stimulated by histamine requires Ca^{2+} influx. **Biochem J**, v. 330 (Pt 2), p. 695-9, Mar 1 1998.

LATTA, H.; LEE, T. C. Effects of excessive sodium chloride on the juxtaglomerular apparatus and blood pressure of uninephrectomized rats. **Lab Invest**, v. 49, n. 1, p. 99-106, Jul 1983.

LAUFS, U. et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. **Circulation**, v. 109, n. 2, p. 220-6, Jan 20 2004.

LAURSEN, J. B. et al. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. **Circulation**, v. 103, n. 9, p. 1282-8, Mar 6 2001.

LAWLOR, D. A.; SMITH, G. D. Early life determinants of adult blood pressure. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 14, n. 3, p. 259-64, May 2005.

LAWRENCE, R. A.; BURK, R. F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 71, n. 4, p. 952-8, Aug 23 1976.

LE, M. T. et al. Effects of high-fructose corn syrup and sucrose on the pharmacokinetics of fructose and acute metabolic and hemodynamic responses in healthy subjects. **Metabolism**, v. 61, n. 5, p. 641-51, May 2012.

LELOUP, A. J. et al. Elastic and Muscular Arteries Differ in Structure, Basal NO Production and Voltage-Gated Ca^{2+} -Channels. **Front Physiol**, v. 6, p. 375, 2015.

LENNON, S. V.; MARTIN, S. J.; COTTER, T. G. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. **Cell Prolif**, v. 24, n. 2, p. 203-14, Mar 1991.

LI, H. et al. Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats. **J Am Coll Cardiol**, v. 47, n. 12, p. 2536-44, Jun 20 2006.

LI, J. et al. Peroxynitrite-induced relaxation in isolated rat aortic rings and mechanisms of action. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 209, n. 3, p. 269-76, Dec 15 2005.

LIOCHEV, S. I.; FRIDOVICH, I. Superoxide and iron: partners in crime. **IUBMB Life**, v. 48, n. 2, p. 157-61, Aug 1999.

LOPEZ-JARAMILLO, P. et al. The crucial role of physiological Ca^{2+} concentrations in the production of endothelial nitric oxide and the control of vascular tone. **Br J Pharmacol**, v. 101, n. 2, p. 489-93, Oct 1990.

MANGGE, H. et al. Antioxidants, inflammation and cardiovascular disease. **World J Cardiol**, v. 6, n. 6, p. 462-77, Jun 26 2014.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur J Biochem**, v. 47, n. 3, p. 469-74, Sep 16 1974.

MARLA, S. S.; LEE, J.; GROVES, J. T. Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 26, p. 14243-8, Dec 23 1997.

MAYES, P. A. Intermediary metabolism of fructose. **Am J Clin Nutr**, v. 58, n. 5 Suppl, p. 754s-765s, Nov 1993.

MCFADZEAN, I.; GIBSON, A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. **Br J Pharmacol**, v. 135, n. 1, p. 1-13, Jan 2002.

MCKINLEY, M. J.; DENTON, D. A.; WEISINGER, R. S. Sensors for antidiuresis and thirst--osmoreceptors or CSF sodium detectors? **Brain Res**, v. 141, n. 1, p. 89-103, Feb 3 1978.

MERKEL, L. A. et al. Demonstration of vasorelaxant activity with an A1-selective adenosine agonist in porcine coronary artery: involvement of potassium channels. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 260, n. 2, p. 437-43, Feb 1992.

MICHEL, C. C. Capillaries, caveolae, calcium and cyclic nucleotides: a new look at microvascular permeability. **J Mol Cell Cardiol**, v. 30, n. 12, p. 2541-6, Dec 1998.

MICHELAKIS, E. D. et al. Potassium channel diversity in vascular smooth muscle cells. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 75, n. 7, p. 889-97, Jul 1997.

MILLER, C. et al. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca^{2+} -activated K^{+} channels from mammalian skeletal muscle. **Nature**, v. 313, n. 6000, p. 316-8, Jan 24-30 1985.

MILLER, V. M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent contractions to arachidonic acid are mediated by products of cyclooxygenase. **Am J Physiol**, v. 248, n. 4 Pt 2, p. H432-7, Apr 1985.

MILSTIEN, S.; KATUSIC, Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 263, n. 3, p. 681-4, Oct 5 1999.

MIYAMOTO, Y. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. **Hypertension**, v. 32, n. 1, p. 3-8, Jul 1998.

MOLLNAU, H. et al. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. **Circ Res**, v. 90, n. 4, p. E58-65, Mar 8 2002.

MOMBOULI, J. V.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. **Trends Pharmacol Sci**, v. 18, n. 7, p. 252-6, Jul 1997.

MONCADA, S. et al. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, v. 263, n. 5579, p. 663-5, Oct 21 1976.

MONCADA, S. et al. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI_2) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. **Thromb Res**, v. 11, n. 3, p. 323-44, Sep 1977.

MOUNT, P. F.; KEMP, B. E.; POWER, D. A. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. **J Mol Cell Cardiol**, v. 42, n. 2, p. 271-9, Feb 2007.

MOZAFFARIAN, D. et al. Global sodium consumption and death from cardiovascular causes. **N Engl J Med**, v. 371, n. 7, p. 624-34, Aug 14 2014.

MUELLER, C. F. et al. ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, n. 2, p. 274-8, Feb 2005.

MULLER, D. N. et al. Immunosuppressive treatment protects against angiotensin II-induced renal damage. **Am J Pathol**, v. 161, n. 5, p. 1679-93, Nov 2002.

MULVANY, M. J.; AALKJAER, C. Structure and function of small arteries. **Physiol Rev**, v. 70, n. 4, p. 921-61, Oct 1990.

MUNZEL, T. et al. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, n. 8, p. 1551-7, Aug 2005.

MURAD, F. et al. Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. **Adv Cyclic Nucleotide Res**, v. 9, p. 145-58, 1978.

NAGAO, T.; VANHOUTTE, P. M. Hyperpolarization as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery. **J Physiol**, v. 445, p. 355-67, Jan 1992.

NAGASE, M. Activation of the aldosterone/mineralocorticoid receptor system in chronic kidney disease and metabolic syndrome. **Clin Exp Nephrol**, v. 14, n. 4, p. 303-14, Aug 2010.

NAKAGAWA, T. et al. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 290, n. 3, p. F625-31, Mar 2006.

NAKAYAMA, T. et al. Dietary fructose causes tubulointerstitial injury in the normal rat kidney. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 298, n. 3, p. F712-20, Mar 2010.

NELSON, M. T.; BRAYDEN, J. E. Regulation of arterial tone by calcium-dependent K⁺ channels and ATP-sensitive K⁺ channels. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 7 Suppl 3, p. 605-10, Aug 1993.

NELSON, M. T. et al. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. **Am J Physiol**, v. 259, n. 1 Pt 1, p. C3-18, Jul 1990.

NELSON, M. T.; QUAYLE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am J Physiol**, v. 268, n. 4 Pt 1, p. C799-822, Apr 1995.

NOLA, I. A. et al. [Dietary habits and cardiovascular diseases]. **Acta Med Croatica**, v. 64, n. 2, p. 89-95, May 2010.

O'ROURKE, M. Arterial stiffness, systolic blood pressure, and logical treatment of arterial hypertension. **Hypertension**, v. 15, n. 4, p. 339-47, Apr 1990.

OHTSU, H. et al. Angiotensin II signal transduction through small GTP-binding proteins: mechanism and significance in vascular smooth muscle cells. **Hypertension**, v. 48, n. 4, p. 534-40, Oct 2006.

ONOUÉ, H.; KATUSIC, Z. S. Role of potassium channels in relaxations of canine middle cerebral arteries induced by nitric oxide donors. **Stroke**, v. 28, n. 6, p. 1264-70; discussion 1270-1, Jun 1997.

OPARIL, S.; SCHMIEDER, R. E. New approaches in the treatment of hypertension. **Circ Res**, v. 116, n. 6, p. 1074-95, Mar 13 2015.

ORTIZ, M. C. et al. Role of endothelin and isoprostanes in slow pressor responses to angiotensin II. **Hypertension**, v. 37, n. 2 Pt 2, p. 505-10, Feb 2001.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524-6, Jun 11-17 1987.

PARAVICINI, T. M.; TOUYZ, R. M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care**, v. 31 Suppl 2, p. S170-80, Feb 2008.

PELAEZ, L. I. et al. Low-dose angiotensin II enhances pressor responses without causing sustained hypertension. **Hypertension**, v. 42, n. 4, p. 798-801, Oct 2003.

POLESE, A. et al. Upward shift of the lower range of coronary flow autoregulation in hypertensive patients with hypertrophy of the left ventricle. **Circulation**, v. 83, n. 3, p. 845-53, Mar 1991.

PORTER, N. A.; CALDWELL, S. E.; MILLS, K. A. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids**, v. 30, n. 4, p. 277-90, Apr 1995.

PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Prog Neurobiol**, v. 64, n. 1, p. 51-68, May 2001.

QUAYLE, J. M.; NELSON, M. T.; STANDEN, N. B. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. **Physiol Rev**, v. 77, n. 4, p. 1165-232, Oct 1997.

QUIJANO, C. et al. Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. **Biochem J**, v. 322 (Pt 1), p. 167-73, Feb 15 1997.

RADI, R. et al. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **J Biol Chem**, v. 266, n. 7, p. 4244-50, Mar 5 1991.

RADI, R. et al. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. **Free Radic Biol Med**, v. 33, n. 11, p. 1451-64, Dec 1 2002.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. **Br J Pharmacol**, v. 92, n. 1, p. 181-7, Sep 1987.

RAPOPORT, R. M.; MURAD, F. Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. **J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res**, v. 9, n. 4-5, p. 281-96, 1983.

Revista brasileira de Hipertensão. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010

RIDLEY, A. J. Rho: theme and variations. **Curr Biol**, v. 6, n. 10, p. 1256-64, Oct 1 1996.

RILEY, D. P. Functional mimics of superoxide dismutase enzymes as therapeutic agents. (Chem. Rev. 1999, 99, 2573-2587. Published on the web july 27, 1999). **Chem Rev**, v. 100, n. 3, p. 1165, Mar 8 2000.

RIZKALLA, S. W. Health implications of fructose consumption: A review of recent data. **Nutr Metab (Lond)**, v. 7, p. 82, 2010.

RODRIGO, G. C.; STANDEN, N. B. ATP-sensitive potassium channels. **Curr Pharm Des**, v. 11, n. 15, p. 1915-40, 2005.

RUBANYI, G. M.; ROMERO, J. C.; VANHOUTTE, P. M. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. **Am J Physiol**, v. 250, n. 6 Pt 2, p. H1145-9, Jun 1986.

SACKS, F. M. et al. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. DASH-Sodium Collaborative Research Group. **N Engl J Med**, v. 344, n. 1, p. 3-10, Jan 4 2001.

SAFAVI, M. et al. Complexes of 2-hydroxyacetophenone semicarbazones: A novel series of superoxide dismutase mimetics. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 20, n. 10, p. 3070-3, May 15 2010.

SAMAI, M. et al. Comparison of the effects of the superoxide dismutase mimetics EUK-134 and tempol on paraquat-induced nephrotoxicity. **Free Radic Biol Med**, v. 43, n. 4, p. 528-34, Aug 15 2007.

SANCHEZ-LOZADA, L. G. et al. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 292, n. 1, p. F423-9, Jan 2007.

SANCHEZ-LOZADA, L. G. et al. Mild hyperuricemia induces vasoconstriction and maintains glomerular hypertension in normal and remnant kidney rats. **Kidney Int**, v. 67, n. 1, p. 237-47, Jan 2005.

SAPER, C. B. The central autonomic nervous system: conscious visceral perception and autonomic pattern generation. **Annu Rev Neurosci**, v. 25, p. 433-69, 2002.

SATO, K.; OZAKI, H.; KARAKI, H. Multiple effects of caffeine on contraction and cytosolic free Ca^{2+} levels in vascular smooth muscle of rat aorta. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 338, n. 4, p. 443-8, Oct 1988.

SCHAEFER, E. J.; GLEASON, J. A.; DANSINGER, M. L. Dietary fructose and glucose differentially affect lipid and glucose homeostasis. **J Nutr**, v. 139, n. 6, p. 1257s-1262s, Jun 2009.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic Biol Med**, v. 30, n. 11, p. 1191-212, Jun 1 2001.

SCHINI, V. B. et al. Interleukin-1 beta induces the production of an L-arginine-derived relaxing factor from cultured smooth muscle cells from rat aorta. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 176, n. 1, p. 114-21, Apr 15 1991.

SCHLAICH, M. P. et al. Sympathetic augmentation in hypertension: role of nerve firing, norepinephrine reuptake, and Angiotensin neuromodulation. **Hypertension**, v. 43, n. 2, p. 169-75, Feb 2004.

SCHLOSSMANN, J. et al. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . **Nature**, v. 404, n. 6774, p. 197-201, Mar 9 2000.

SCHWARZ, J. M. et al. Thermogenesis and fructose metabolism in humans. **Am J Physiol**, v. 262, n. 5 Pt 1, p. E591-8, May 1992.

SCOTLAND, R. S. et al. An endothelium-derived hyperpolarizing factor-like factor moderates myogenic constriction of mesenteric resistance arteries in the absence of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide. **Hypertension**, v. 38, n. 4, p. 833-9, Oct 2001.

SEASHOLTZ, T. M.; MAJUMDAR, M.; BROWN, J. H. Rho as a mediator of G protein-coupled receptor signaling. **Mol Pharmacol**, v. 55, n. 6, p. 949-56, Jun 1999.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, v. 25, n. 1, p. 192-205, Oct 24 1968.

SHIMASAKI, Y. et al. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol**, v. 31, n. 7, p. 1506-10, Jun 1998.

SHIMOKAWA, H. et al. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 28, n. 5, p. 703-11, Nov 1996.

SHINOZAKI, K. et al. Abnormal biopterin metabolism is a major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/O₂- imbalance in insulin-resistant rat aorta. **Diabetes**, v. 48, n. 12, p. 2437-45, Dec 1999.

SINDHU, R. K. et al. Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal insufficiency. **Biochim Biophys Acta**, v. 1743, n. 1-2, p. 86-92, Mar 22 2005.

SINGH, A. K. et al. Fructose-induced hypertension: essential role of chloride and fructose absorbing transporters PAT1 and Glut5. **Kidney Int**, v. 74, n. 4, p. 438-47, Aug 2008.

SLADE, A. N.; KIM, H. Dietary responses to a hypertension diagnosis: evidence from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007-2010. **Behav Med**, v. 40, n. 1, p. 1-13, 2014.

SMITH, W. L.; GARAVITO, R. M.; DEWITT, D. L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. **J Biol Chem**, v. 271, n. 52, p. 33157-60, Dec 27 1996.

SOBEY, C. G. Potassium channel function in vascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, n. 1, p. 28-38, Jan 2001.

SOLEIMANI, M.; ALBORZI, P. The role of salt in the pathogenesis of fructose-induced hypertension. **Int J Nephrol**, v. 2011, p. 392708, 2011.

SOLTIS, E. E.; CASSIS, L. A. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. **Clin Exp Hypertens A**, v. 13, n. 2, p. 277-96, 1991.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **J Physiol**, v. 522 Pt 2, p. 177-85, Jan 15 2000.

SOMLYO, A. P. et al. Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 134, p. 201-34, 1999.

SOUZA NETO, E. P.; NEIDECKER, J.; LEHOT, J. J. [To understand blood pressure and heart rate variability]. **Ann Fr Anesth Reanim**, v. 22, n. 5, p. 425-52, May 2003.

SPINK, J.; COHEN, J.; EVANS, T. J. The cytokine responsive vascular smooth muscle cell enhancer of inducible nitric oxide synthase. Activation by nuclear factor-kappa B. **J Biol Chem**, v. 270, n. 49, p. 29541-7, Dec 8 1995.

STRAUB, V. A. et al. Modulation of serotonergic neurotransmission by nitric oxide. **J Neurophysiol**, v. 97, n. 2, p. 1088-99, Feb 2007.

STROES, E. et al. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. **J Clin Invest**, v. 99, n. 1, p. 41-6, Jan 1 1997.

SURKS, H. K. et al. Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase Ialpha. **Science**, v. 286, n. 5444, p. 1583-7, Nov 19 1999.

SUZUKI, H. et al. Activation of endothelial nitric oxide synthase by the angiotensin II type 1 receptor. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, p. 5914-20, Dec 2006.

SUZUKI, H. et al. Recent progress in signal transduction research of the angiotensin II type-1 receptor: protein kinases, vascular dysfunction and structural requirement. **Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents**, v. 3, n. 4, p. 305-22, Oct 2005.

SUZUKI, Y. J.; FORD, G. D. Redox regulation of signal transduction in cardiac and smooth muscle. **J Mol Cell Cardiol**, v. 31, n. 2, p. 345-53, Feb 1999.

TAKAHASHI, H. et al. The central mechanism underlying hypertension: a review of the roles of sodium ions, epithelial sodium channels, the renin-angiotensin-aldosterone system, oxidative stress and endogenous digitalis in the brain. **Hypertens Res**, v. 34, n. 11, p. 1147-60, Nov 2011.

TAKUWA, Y. Regulation of vascular smooth muscle contraction. The roles of Ca^{2+} , protein kinase C and myosin light chain phosphatase. **Jpn Heart J**, v. 37, n. 6, p. 793-813, Nov 1996.

TAPPY, L. et al. Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. **Nutrition**, v. 26, n. 11-12, p. 1044-9, Nov-Dec 2010.

THOMAS, R. M. et al. Endocrine hypertension: An overview on the current etiopathogenesis and management options. **World J Hypertens**, v. 5, n. 2, p. 14-27, 2015.

THOMAS, S. R.; CHEN, K.; KEANEY, J. F., JR. Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. **J Biol Chem**, v. 277, n. 8, p. 6017-24, Feb 22 2002.

THOMSON, L. et al. Kinetics of cytochrome c^{2+} oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems. **Arch Biochem Biophys**, v. 319, n. 2, p. 491-7, Jun 1 1995.

THORNTON, S. N. Thirst and hydration: physiology and consequences of dysfunction. **Physiol Behav**, v. 100, n. 1, p. 15-21, Apr 26 2010.

TOUYZ, R. M.; BRIONES, A. M. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. **Hypertens Res**, v. 34, n. 1, p. 5-14, Jan 2011.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. **Pharmacol Rev**, v. 52, n. 4, p. 639-72, Dec 2000.

TSIKAS, D. et al. GC-MS determination of creatinine in human biological fluids as pentafluorobenzyl derivative in clinical studies and biomonitoring: Inter-laboratory comparison in urine with Jaffe, HPLC and enzymatic assays. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 878, n. 27, p. 2582-92, Oct 1 2010.

UEHATA, M. et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. **Nature**, v. 389, n. 6654, p. 990-4, Oct 30 1997.

URAKAMI-HARASAWA, L. et al. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. **J Clin Invest**, v. 100, n. 11, p. 2793-9, Dec 1 1997.

VALLANCE, P.; COLLIER, J.; MONCADA, S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. **Lancet**, v. 2, n. 8670, p. 997-1000, Oct 28 1989.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 38, p. 97-120, 1998.

VASA, M. et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. **Circulation**, v. 103, n. 24, p. 2885-90, Jun 19 2001.

VASDEV, S. et al. Fructose-induced hypertension in Wistar-Kyoto rats: interaction with moderately high dietary salt. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 85, n. 3-4, p. 413-21, Mar-Apr 2007a.

VASDEV, S. et al. Effect of moderately high dietary salt and lipoic acid on blood pressure in Wistar-Kyoto rats. **Exp Clin Cardiol**, v. 12, n. 2, p. 77-81, Summer 2007b.

VELTMAR, A.; GOHLKE, P.; UNGER, T. From tissue angiotensin converting enzyme inhibition to antihypertensive effect. **Am J Hypertens**, v. 4, n. 3 Pt 2, p. 263s-269s, Mar 1991.

VERMA, S.; BHANOT, S.; MCNEILL, J. H. Sympathectomy prevents fructose-induced hyperinsulinemia and hypertension. **Eur J Pharmacol**, v. 373, n. 2-3, p. R1-4, Jun 4 1999.

VOS, M. B. et al. Dietary fructose consumption among US children and adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Medscape J Med**, v. 10, n. 7, p. 160, 2008.

WALFORD, G.; LOSCALZO, J. Nitric oxide in vascular biology. **J Thromb Haemost**, v. 1, n. 10, p. 2112-8, Oct 2003.

WALTER, D. H. et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. **Circulation**, v. 105, n. 25, p. 3017-24, Jun 25 2002.

WANG, X. L.; WANG, J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. **Mol Genet Metab**, v. 70, n. 4, p. 241-51, Aug 2000.

WARD, N. C. et al. Oxidative stress in human hypertension: association with antihypertensive treatment, gender, nutrition, and lifestyle. **Free Radic Biol Med**, v. 36, n. 2, p. 226-32, Jan 15 2004.

WASSMANN, S.; WASSMANN, K.; NICKENIG, G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. **Hypertension**, v. 44, n. 4, p. 381-6, Oct 2004.

WATANABE, C. et al. Mechanisms of caffeine-induced contraction and relaxation of rat aortic smooth muscle. **J Physiol**, v. 456, p. 193-213, Oct 1992.

WATANABE, T.; BARKER, T. A.; BERK, B. C. Angiotensin II and the endothelium: diverse signals and effects. **Hypertension**, v. 45, n. 2, p. 163-9, Feb 2005.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Adv Physiol Educ**, v. 27, n. 1-4, p. 201-6, Dec 2003.

WEI, A. D. et al. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. **Pharmacol Rev**, v. 57, n. 4, p. 463-72, Dec 2005.

WEISS, D.; KOOLS, J. J.; TAYLOR, W. R. Angiotensin II-induced hypertension accelerates the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. **Circulation**, v. 103, n. 3, p. 448-54, Jan 23 2001.

WHITE, R. E. et al. Potassium channel stimulation by natriuretic peptides through cGMP-dependent dephosphorylation. **Nature**, v. 361, n. 6409, p. 263-6, Jan 21 1993.

WHITWORTH, J. A.; CHALMERS, J. World health organisation-international society of hypertension (WHO/ISH) hypertension guidelines. **Clin Exp Hypertens**, v. 26, n. 7-8, p. 747-52, Oct-Nov 2004.

WIDDER, J. D. et al. Regulation of tetrahydrobiopterin biosynthesis by shear stress. **Circ Res**, v. 101, n. 8, p. 830-8, Oct 12 2007.

WILCOX, J. N. et al. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 17, n. 11, p. 2479-88, Nov 1997.

WILLIAMS, B. The year in hypertension. **J Am Coll Cardiol**, v. 55, n. 1, p. 65-73, Dec 29 2009.

WILLIAMS, B. et al. British Hypertension Society guidelines for hypertension management 2004 (BHS-IV): summary. **Bmj**, v. 328, n. 7440, p. 634-40, Mar 13 2004.

WIRTH, A. Rho kinase and hypertension. **Biochim Biophys Acta**, v. 1802, n. 12, p. 1276-84, Dec 2010.

WRAY, G. M. et al. Selective inhibition of the activity of inducible nitric oxide synthase prevents the circulatory failure, but not the organ injury/dysfunction, caused by endotoxin. **Shock**, v. 9, n. 5, p. 329-35, May 1998.

WU, H. et al. Up-regulation of intrarenal renin-angiotensin system contributes to renal damage in high-salt induced hypertension rats. **Kidney Blood Press Res**, v. 39, n. 6, p. 526-35, 2014.

XU, K. Y. et al. Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 2, p. 657-62, Jan 19 1999.

YAN, C. et al. Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, n. 1, p. 26-36, Jan 1 2003.

YANAGISAWA, N. et al. Enhanced production of nitric oxide, reactive oxygen species, and pro-inflammatory cytokines in very long chain saturated fatty acid-accumulated macrophages. **Lipids Health Dis**, v. 7, p. 48, 2008.

YANG, L. et al. Protein kinase G phosphorylates Cav1.2 $\alpha 1c$ and $\beta 2$ subunits. **Circ Res**, v. 101, n. 5, p. 465-74, Aug 31 2007.

YANG, Q. et al. A novel cyclic GMP stimulated phosphodiesterase from rat brain. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 205, n. 3, p. 1850-8, Dec 30 1994.

YANG, Y. et al. Effects of high fructose and salt feeding on systematic metabolome probed via (1) H NMR spectroscopy. **Magn Reson Chem**, v. 53, n. 4, p. 295-303, Apr 2015.

YOSHIDA, T. et al. Glutathione peroxidase knockout mice are susceptible to myocardial ischemia reperfusion injury. **Circulation**, v. 96, n. 9 Suppl, p. li-216-20, Nov 4 1997.

YU, H. C. et al. Salt induces myocardial and renal fibrosis in normotensive and hypertensive rats. **Circulation**, v. 98, n. 23, p. 2621-8, Dec 8 1998.

ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P. M.; LEUNG, S. W.S. $\alpha 1$ -adrenoceptor activation of PKC- ϵ causes heterologous desensitization of thromboxane receptors in the aorta of spontaneously hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**, 172, p. 3687-3781, March 31 2015.

ZEMANCIKOVA, A.; TOROK, J. Cardiovascular effects of high-fructose intake in rats with nitric oxide deficiency. **Interdiscip Toxicol**, v. 7, n. 3, p. 159-64, Sep 2014.

ZHANG, A.; CHENG, T. P.; ALTURA, B. M. Magnesium regulates intracellular free ionized calcium concentration and cell geometry in vascular smooth muscle cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1134, n. 1, p. 25-9, Feb 19 1992.

ZHANG, A. et al. Mg²⁺ and caffeine-induced intracellular Ca²⁺ release in human vascular endothelial cells. **Br J Pharmacol**, v. 109, n. 2, p. 291-2, Jun 1993.

ZHANG, Y. et al. Vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension is mediated by vascular smooth muscle cell-derived H₂O₂. **Hypertension**, v. 46, n. 4, p. 732-7, Oct 2005.

ZHAO, F. Q.; KEATING, A. F. Functional properties and genomics of glucose transporters. **Curr Genomics**, v. 8, n. 2, p. 113-28, Apr 2007.

ZICHA, J.; DOBESOVA, Z.; KUNES, J. Relative deficiency of nitric oxide-dependent vasodilation in salt-hypertensive Dahl rats: the possible role of superoxide anions. **J Hypertens**, v. 19, n. 2, p. 247-54, Feb 2001.

ZUCCHI, R.; RONCA-TESTONI, S. The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. **Pharmacol Rev**, v. 49, n. 1, p. 1-51, Mar 1997.